Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel
und dem Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Bernhard Schmidt

Die antibakterielle Aktivität einiger einheimischer Plantago-Arten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörn ELICH
aus Berlin

1962

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel
und dem Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Bernhard Schmidt

Die antibakterielle Aktivität einiger einheimischer Plantago-Arten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörn Elich
aus
Berlin

Meiner lieben Frau gewidmet

1. Referent: Prof. Dr. R. Hänsel
2. " Prof. Dr. G. Schenck
3. " Prof. Dr. B. Schmidt

Tag der mündl. Prüfung: 30. I. 1962

Tag der Promotion: 28. II. 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. HÄNSEL und am Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. B. SCHMIDT durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Dr. R. HÄNSEL für seine wertvollen Ratschläge, das große Interesse und die Förderung, die er meiner Arbeit entgegenbrachte, herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. B. SCHMIDT für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und des bakteriologischen Untersuchungsmaterials sowie der Hinweise und Ratschläge für meine Arbeit.

Herrn Dr. E. WINDE danke ich für seine zahlreichen Ratschläge, die er mir aufgrund seiner großen Erfahrungen über die Pseudoindikane angedeihen ließ.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Professor Dr. G. SCHENCK, Direktor des Pharmazeutischen Institutes der Freien Universität Berlin, für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung der Bibliothek und der Geräte und Apparaturen des Pharmazeutischen Institutes, sowie den Herren Dr. K.H. KOLB vom Institut für Tierzucht und Erbpathologie und Dr. M. SIEGERT vom Institut für Veterinär-Pharmakologie der Freien Universität Berlin für die Unterstützung bei den Tierversuchen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung und Problemstellung	6
"Antibiotika" aus höheren Pflanzen	10
Die Gattung Plantago - Botanik und Pharmakognosie	14
Bisher durchgeführte chemische Untersuchungen	15
Bisher durchgeführte Untersuchungen über die antibakterielle Wirkung einiger Plantago-Arten	22
Hauptteil	
I. Phytochemische Untersuchungen	26
a) Voruntersuchungen der Plantagoextrakte mit Hilfe der Papierchromatographie	26
b) Isolierung von Aucubin aus den Blättern von Plantago media L.	28
c) Isolierung von Aucubin aus den Samen von Plantago lanceolata L.	28
d) Photometrische Bestimmung von Aucubin	29
e) Versuche zur Gewinnung und Papierchromatographie von Aucubigenin	30
f) Isolierung und Charakterisierung eines Triterpens: der Ursolsäure	31
g) Papierchromatographische Untersuchungen des Wurzelextraktes von Veronica virginica L.	32
II. Bakteriologische Untersuchungen	33
a) Teste mit einer wässerigen Lösung des Aucubinhydrolysates	33
b) Teste mit den Frischpflanzenpreßsäften aus Plantago lanceolata und P.media	38
c) Teste mit der Handelsware "Herba Plantaginis lanceolatae Erg.-Buch 6"	42
d) Bestimmung der Wirkungsgrenze von Chlorogensäure	45

Seite

e) Teste mit Kaninchenurin nach Fütterung mit den Blättern von Plantago media 45
f) Teste mit Agnusid 46
g) Teste mit Asperulosid 47
h) Teste mit dem Pseudoindikan aus Veronica virginica L. 47
Diskussion 49
Zusammenfassung 51
Versuchsteil
I. Phytochemische Untersuchungen 54
a) Papierchromatographische Untersuchungen 54
b) Isolierung von Aucubin aus den Blättern von Plantago media 55
c) Isolierung von Aucubin aus den Samen von Plantago lanceolata 57
d) Photometrische Bestimmung von Aucubin 59
e) Papierchromatographische Untersuchung des Aucubinhydrolysates 66
f) Isolierung und Charakterisierung der Ursolsäure 68
g) Isolierung von Agnusid 70
h) Papierchromatographische Untersuchungen der Wurzelextrakte von Veronica virginica L. 70
II. Bakteriologische Untersuchungen 71
a) Allgemeine Arbeitsmethode 71
b) Teste mit einer wässerigen Lösung des Aucubinhydrolysates 71
c) Teste mit den Frischpflanzenpreßsäften aus Plantago lanceolata und P.media 72
d) Teste mit der Handelsware "Herba Plantaginis lanceolatae Erg.-Buch 6" 72
e) Untersuchung des Kaninchenurins 73
f) Herstellung eines asperulosidhaltigen Extraktes aus Galium aparine L. 75
g) Herstellung der Testlösungen aus den Wurzeln von Veronica virginica L. 75
Literaturverzeichnis 77
Lebenslauf 80

Einleitung und Problemstellung

Zahlreiche Arzneipflanzen, die uns aus früheren Jahrhunderten überliefert worden sind, werden heute fast ausschließlich nur noch in der Volksheilkunde verwendet. Ist nun die Anwendung dieser Pflanzen empirisch begründet, oder beruht die vermeintliche Wirkung auf suggestiver Vorstellung? Es wurden doch einige "Wunderdrogen" benutzt, denen man nur aufgrund mythologischer Vorstellungen Heilkräfte zusprach. Exakte pharmakologische Untersuchungen ergaben keine Anhaltspunkte für eine therapeutische Verwendung dieser Pflanzen. Andererseits sind auch alte Heilpflanzen wiederentdeckt worden, die eine wertvolle Bereicherung des Arzneimittelschatzes darstellen. Als Beispiel kann Convallaria majalis L. dienen. Diese Pflanze wurde seit dem 15. Jahrhundert als Herzstärkungsmittel verwendet, geriet aber im 18. Jahrhundert in Vergessenheit. In der Mitte des vorigen Jahrhunderts wurde die Convallaria nach chemischen und pharmakologischen Untersuchungen wieder in die Therapie eingeführt und nimmt heute einen festen Platz unter den herzwirksamen Drogen ein (G.RATH[53]).

Es ist eines der Ziele der modernen Pharmakognosie, die wirksamen Inhaltsstoffe der Arzneipflanzen zu isolieren und chemisch zu charakterisieren. Der Pharmakologe ist dann in der Lage, eine Verwendung der Drogen in der modernen Medizin durch Untersuchungen zu begründen oder abzulehnen. A.G.WINTER und L.WILLEKE[71]) stellten bei ihren Untersuchungen der Heilpflanzen, die in dem alten Kräuterbuch des MATTHIOLUS[43]) beschrieben sind, folgende Frage: Enthalten die Pflanzen pharmakologisch feststellbare Substanzen, die eine Verwendung auch heute noch rechtfertigen? Das Ergebnis ihrer Untersuchungen zeigte, daß häufig wirksame Prinzipien in diesen alten Drogen enthalten sind.

Zu den alten Heilpflanzen gehören auch unsere einheimischen Plantago-Arten, denen, äußerlich angewendet, eine wundheilende und entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben wird. Auch heute noch werden die frischen Blätter des Wegerichs in der Volksheilkunde, vorwiegend in osteuropäischen Ländern, zur Wundheilung verwendet.

Über diese Droge liegen einige Arbeiten aus den letzten Jahren vor (R.K.ALIEV[1], E.FREERKSEN und R.BÖNICKE[18], B.I.MONASTYRSKAYA und A.A.PETROPAVLOVSKAYA[45] sowie M.FELKOVA[16], in denen teilweise von einer antibakteriellen und teilweise von einer wundheilenden Wirksamkeit berichtet wird.

Ich stellte mir die Aufgabe, das antibakterielle Prinzip einiger einheimischer Plantago-Arten aufzufinden und ein bakteriologisches Wirkungsspektrum der betreffenden Substanz aufzustellen.

Für eine derartige Untersuchung sind nun zwei Arbeitswege möglich:

a) Der biologische Test als Leitfaden der Isolierung. Die Droge wird mit verschiedenen Extraktionsmitteln ausgezogen und jede einzelne Fraktion wird auf ihre Wirkung biologisch geprüft. Dabei kann versucht werden, das aktive Prinzip so weit zu fraktionieren und anzureichern, bis der Wirkstoff in reiner Form vorliegt.

b) Wirkstoffsuche aufgrund einer Arbeitshypothese. Zu derartigen Arbeitshypothesen können vergleichend phytochemische Betrachungen oder vermutete Konstitutions-Wirkungsbeziehungen führen. Eine seit SERTÜRNER bekannte und überdies die erfolgreichste von derartigen Arbeitshypothesen ist die, daß die Drogenwirkung an die basischen Inhaltsstoffe geknüpft ist; Hunderte von Drogenwirkstoffen (Alkaloide) konnten auf diese Weise isoliert werden, ohne daß es des Einsetzens tierexperimenteller Methoden <u>während</u> der phytochemischen Aufarbeitung bedurft hätte. Ähnliche auf Induktion beruhende Arbeitshypothesen

sind z.B. die Prüfung auf Anthrachinone bei Drogen, denen eine laxierende Wirkung nachgesagt wird, oder auf Cardenolide, denen Herzwirksamkeit zugeschrieben wird, u.a.m.

Bei meinen Untersuchungen ging ich von der zweiten Möglichkeit aus. Die einheimischen Arten der Gattung Plantago enthalten in den vegetativen Organen Aucubin (L.BOURDIER[6]). In Verbindung mit ß-glukosidspaltenden Fermenten ist aber das Aucubin eine Substanz von Wirkstoffcharakter; es bewirkt die antibakteriellen Eigenschaften von Aucuba japonica Thunbg. (J.E.ROMBOUTS und J.LINKS[57]). Es bestand daher die Möglichkeit, daß diese Substanz die antibakteriellen Fähigkeiten der Plantago-Arten hervorruft.

Bei einer kurzen Betrachtung des Problems scheint die vorliegende Arbeit nur eine Analogie-Untersuchung darzustellen. Die zahlreichen Widersprüche der bisher vorliegenden Untersuchungen rechtfertigen jedoch eine erneute Bearbeitung der Frage. Aucubin ist bei Anwesenheit von glukosidspaltenden Fermenten sehr instabil, es entsteht schnell ein braunschwarzes Polymerisat. Nach J.E.ROMBOUTS und J.LINKS[57] ist der Wirkstoff von Aucuba japonica thermolabil; dagegen bezeichnen E.FREERKSEN und R.BÖNICKE[18] das antibakterielle Prinzip der Plantago-Arten als weitgehend thermostabil. R.L.ROSENFELD und L.J.CHAZANOWITSCH[58] halten den Plantago-Wirkstoff für ein flüchtiges Phytoncid. Auch die Angaben über die Wirksamkeit der Plantagozubereitungen gegenüber verschiedenen Mikroorganismen sind widersprechend: M.FELKLOVA[16] und E.M.OSBORN[49] konnten gegen Escherichia coli keine Aktivität bemerken, E.FREERKSEN und R.BÖNICKE berichten dagegen von einer bakteriostatischen Wirkung auf diesen Teststamm. B.I.MONASTYRSKAYA und A.A.PETROPAVLOVSKAYA[45] konnten nicht die geringste Aktivität der Plantagoextrakte gegenüber verschiedenen Mikroorganismen feststellen.

Es war daher nach unserer Meinung lohnend, das Problem der antibakteriellen Aktivität der Plantago-Arten aufzugreifen und die vorliegenden Ergebnisse kritisch zu überprüfen. Deshalb

mußte zuerst reines Aucubin isoliert werden, das Glukosid und das Hydrolyseprodukt bakteriologisch getestet werden. Ebenfalls mußten aucubinhaltiger und -freier Plantagosaft sowie weitere Inhaltsstoffe der Droge einer exakten Bearbeitung unterzogen werden.

Abschließend sollten noch weitere Substanzen aus der Gruppe der Pseudoindikane auf eine antibakterielle Aktivität geprüft werden. Zur Verfügung standen: das Agnusid aus Vitex agnus castus L. (Verbenaceae), das Asperulosid aus Galium aparine L. (Rubiaceae) und ein Pseudoindikan unbekannter Struktur aus Veronica virginica L. (Leptandra virginica Nutt.) (Scrophulariaceae).

"Antibiotika" aus höheren Pflanzen

Der Begriff "ANTIBIOSE" wurde schon 1889 von VUILLEMIN und WARD als Gegensatz zur "SYMBIOSE" geprägt. Im heutigen Sinn ist der Terminus "ANTIBIOTIKUM" von S.A.WAKSMAN aufgestellt und folgendermaßen definiert worden: Ein Antibiotikum ist eine chemische Substanz, die von Mikroorganismen produziert wird und die die Fähigkeit besitzt, das Wachstum der Bakterien und anderer Mikroorganismen zu hemmen oder diese gar zu zerstören.

"An antibiotic is a chemical substance, produced by micro-organisms, which has the capacity to inhibit the growth of and even destroy bacteria and other micro-organisms." (nach F.ROBINSON[55])

1950 schlug W.J.DERENBERG eine andere Definition des Begriffes "ANTIBIOTIKUM" vor:

1. Ein Antibiotikum stellt ein Stoffwechselprodukt dar.
2. Ein Antibiotikum wirkt antagonistisch auf das Wachstum und die Vitalität einer oder mehrerer Mikroorganismenspezies.
3. Ein Antibiotikum ist bereits in außerordentlich geringer Konzentration wirksam (nach H.KÖHLER[39]).

Die beiden Definitionen unterscheiden sich hauptsächlich in Folgendem: WAKSMAN läßt nur Mikroorganismen als Produzenten der Antibiotika zu. DERENBERG dagegen lehnt eine Unterscheidung zwischen antibiotischen Wirkstoffen aus Mikroorganismen einerseits und Makroorganismen andererseits ab.

Beide Ansichten werden auch heute noch vertreten. Forscher, die der Meinung WAKSMANs sind, bezeichnen die antibakteriellen Wirkstoffe aus höheren Pflanzen als "antimikrobielle Substanzen" oder "Phytoncide". Sie begründen ihre Auffassung mit folgenden Fakten: 1. Die wichtigsten therapeutisch verwendeten Antibiotika werden von Mikroorganismen gebildet. 2. Die

Isolierungsmethode dieser Stoffe unterscheidet sich von der Extraktion der Wirkstoffe aus Makroorganismen.

Andere sehen in der Unterscheidung zwischen Wirkstoffen aus niedrigen und höheren Pflanzen nur eine künstliche Grenze. Sie geben folgende Gründe an: 1. Es gibt spezifische Antibiotika, die gleichzeitig von Mikro- und Makroorganismen produziert werden. Ein Beispiel ist das CITRININ. Dieses Antibiotikum wurde sowohl in Penicillium citrinum als auch in der australischen Blütenpflanze Crotolaria crispata nachgewiesen. 2. Mikro- und Makroorganismen bilden gleichermaßen antibiotisch wirksame Stoffwechselprodukte die sich weder biologisch noch chemisch im wesentlichen voneinander unterscheiden. Antibiotika sind daher nicht einzigartige und ungewöhnliche Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen über die antibakterielle Wirksamkeit höherer Pflanzen durchgeführt. E.FREERKSEN und R.BÖNICKE[18] gingen von der Hypothese aus, "daß die Fähigkeit zur Produktion antibakterieller Substanzen von Wirkstoffcharakter nicht eine Besonderheit nur weniger mikrobischer Organismen ist, sondern prinzipiell als allgemeine Fähigkeit aller Lebewesen überhaupt angesehen werden muß". Um diese Vermutung zu begründen, untersuchten sie 550 verschiedene Pflanzenarten, darunter 180 Moospflanzen. Sie konnten bei 29,2 % der Moose und bei 38,9 % der Blüten- und Farnpflanzen eine antibakterielle Wirkung feststellen. Als Testbakterium verwendeten sie Staphylococcus aureus.

A.G.WINTER und L.WILLEKE[70] untersuchten die Heilpflanzen, die in dem alten Kräuterbuch des MATTHIOLUS[43] als Heilmittel gegen Entzündungen beschrieben wurden, auf ihre antibakterielle Aktivität. Unter diesen Pflanzen wies der erstaunlich hohe Anteil von 65 % antimikrobielle Eigenschaften auf. Die Autoren prüften weitere 1283 Arten, von denen 378 = 29,5 % gegen Staphylococcus aureus, Escherichia coli und Bacillus subtilis aktiv waren.

E.M.OSBORN[49] testete 2300 verschiedene Arten aus, davon

enthielten 358 = 16 % Wirkstoffe. Ausführliche Versuche über die antibakteriellen Eigenschaften der Früchte und Samen beschreiben L.FERENCZY[17] sowie J.C.MARUZELLA und M.FREUNDLICH[42]. 512 Samen und Früchte von 88 verschiedenen Familien testete FERENCZY, bei zahlreichen konnte er eine bedeutende Wirkung beobachten. Zu dem gleichen Ergebnis kamen die beiden anderen Autoren bei einer Reihe von Samen. Eine ausführliche Zusammenfassung der bisher durchgeführten Arbeiten wurde von P.DUQUENOIS [13,14] aufgestellt, der zeigen konnte, daß einige Familien (Ranunculacee, Cruciferen, Compositen) besonders befähigt sind, diese Inhaltsstoffe zu bilden.

Nur bei einem kleinen Teil der wirksamen Pflanzen konnte bisher das aktive Prinzip aufgefunden werden. Bekannt ist seit langer Zeit die Fähigkeit vieler Pflanzen in abgestorbenen Zellen Gerbstoffe einzulagern, um so einer bakteriellen Zerstörung entgegen zu treten. Ebenfalls können ätherische Öle diesem Zwecke dienen.

Isoliert werden konnten unter anderen: die Wirkstoffe von Allium sativum (Allicin, C.J.CAVALLITO und J.H.BAILEY[11]), Anemone pulsatilla (Anemonin, E.L.McCAWLEY, B.A.RUBIN und N.J.GIACOMINO[44]), Raphanus sativus (Raphanin, G.IVANOVICS und S.HORVATH[32]), Solanum lycopersicum, (Tomatin, G.W.IRVING, T.D.FONTAINE und S.P.DOOLITTLE[31]) sowie das Benzoxazolinon, das von jungen Roggenpflanzen als aktive Substanz gegen den Schneeschimmel, Fusarium nivale, gebildet wird (A.I.VIRTANEN[65]). Diese Substanzen üben eine starke Hemmwirkung auf das Wachstum vieler Bakterien und niedriger Pilze aus. Eine schwache Wirksamkeit weist auch das Flavonol Quercetin auf (J.NAGHSKI, M.J.COPLEY und F.COUCH[46]), das aber nur unter einem P_H von 7,0 wirksam ist.

Pharmazeutisch und medizinisch von Bedeutung sind die Senfölglykoside der Kapuzinerkresse (Tropaeolum majus) und

des Meerrettichs (Cochlearia armoracia), die in den Handelspräparaten TROMALYT (MADAUS) und RASAPEN (HOMBURG) enthalten sind. Sie werden als "Antibiotika aus höheren Pflanzen" bei Infektionserkrankungen angewendet und können in der Therapie unter bestimmten Voraussetzungen andere Antibiotika ersetzen (A.G.WINTER und L.WILLEKE[70], G.ORZECHOWSKI[48]).

Die Gattung Plantago

Botanik und Pharmakognosie

Plantago lanceolata L., P.major und P.media L. sind die wichtigsten einheimischen Vertreter der Familie der Plantaginaceae. Im natürlichen Pflanzensystem wird diese Familie als eigene Ordnung, Plantaginales, zwischen die Tubiflorae und die Rubiales eingeordnet, da zu beiden Ordnungen enge verwandtschaftliche Beziehungen bestehen (R.PILGER[51]).

Einige Systematiker (so WETTSTEIN oder HALLIER) reihen die Plantaginaceae in die Ordnung der Tubiflorae ein und betrachten sie mit den Scrophulariaceae verwandt. Diese Auffassung würde mit einem phytochemischen Merkmal übereinstimmen. In mehreren Familien der Tubiflorae, - so den Verbenaceae und den Labiaten - und den Scrophulariaceae kommen Glykoside vom Aucubin-Typus vor; die gleichen Stoffe finden wir auch bei den Plantaginaceae. Allerdings sind diese Substanzen auch in anderen Familien (z.B. in der Cornaceae Aucuba japonica Thunbg.) anzutreffen; das Vorkommen von Aucubin und ähnlichen Verbindungen darf daher taxonomisch nicht überbewertet werden.

Ursprünglich sind die drei Arten in Europa, Nord- und Mittelasien beheimatet; heute jedoch sind sie auch in Afrika, Nord- Mittel- und Südamerika, Australien und Neuseeland anzutreffen (F.AUSTER und J.SCHÄFER[2]).

Im Ergänzungsbuch zum DAB 6 sind von diesen drei Arten als Drogen nur Herba Plantaginis lanceolata und Herba Plantaginis majoris aufgeführt. Die Pflanzen sollen ausschließlich während der Blütezeit gesammelt werden. Deshalb bestehen die Drogen aus den Blättern und den Blütenschäften; Samen dürfen nicht vorhanden sein. Im Verlauf des Trocknens tritt eine leichte Verfärbung der Blätter von dunkelgrün nach braungrün auf. Völlig braun dürfen die Blätter aber nicht sein, da sonst ein vollständiger Verlust des Aucubins eingetreten ist.

Verwendet werden diese Drogen fast ausschließlich in der Volksheilkunde gegen katarrhalische Entzündungen der

Schleimhäute und zur Heilung von Furunkeln und Geschwüren (H.SCHULZ[60], G.HEGI[28]).

Bisher durchgeführte chemische Untersuchungen.

Über die verschiedenen Plantago-Arten sind eine Reihe phytochemischer Arbeiten durchgeführt worden. Als wichtigster Inhaltsstoff kann das Glukosid Aucubin gelten, das erstmalig von L.BOURDIER[6] in verschiedenen Pflanzenorganen dieser Arten aufgefunden wurde. Neben diesem Glukosid werden im Ergänzungsbuch 6 zum DAB 6 für die beiden Drogen Herba Plantaginis lanceolatae und Herba Plantaginis majoris noch Schleim und Vitamin C als Inhaltsstoffe angegeben. Die meisten Autoren konnten jedoch Schleim in den Krautdrogen nicht feststellen, nur O.GESSNER[21] hat ihn mit aufgeführt. In den Samen ist allerdings reichlich Schleim enthalten. Einige Vitamin C haltige Drogen des Ergänzungsbuches untersuchte H.BRAUN[8], in den beiden offizinellen Plantago-Arten konnte er keine Ascorbinsäure feststellen. Er vermutete, daß der Verlust durch unsachgemäße Trocknung und Lagerung hervorgerufen worden ist, obwohl die Drogen äußerlich den Anforderungen des Ergänzungsbuches entsprochen hatten. R.K.ALIEV[1] fand dagegen bei seinen Untersuchungen über Plantago major neben Vitamin C eine Reihe weiterer Inhaltsstoffe: Saponine, Bitterstoffe, ätherisches Öl, Harz, Tannine und die Vitamine A und K. M.ROBERG[54] konnte jedoch keine hämolysierenden Saponine in der Droge nachweisen. Ein weiteres Vitamin wurde noch von F.ROLLERI[56] entdeckt, der in einem Aufguß (25 : 500) 0,18 mg Nikotinsäure bestimmen konnte. Rhodan wird von K.GEMEINHARDT[20] noch angegeben, der es in dem Saft von Plantago major zu 20 mg % fand. In größeren Mengen kommen in den trockenen Drogen noch Gerbstoffe vor, und zwar wurden bei Plantago lanceolata 6,55 % und bei Plantago major 4,05 % festgestellt.

Außer den erwähnten Inhaltsstoffen sind noch die Fermente Invertase und Emulsin, das die Hydrolyse des Aucubins durchführen

kann, sowie Lab (nur in Plantago lanceolata) enthalten.

Aus den Samen von Plantago major und Plantago ovata Forsk. konnten N.WATTIEZ und M.HANS[67] ein Trisaccharid, das sie mit Planteose bezeichneten, isolieren. Es besteht aus je einem Mol Glukose, Fructose und Galactose.

Abschließend sei noch erwähnt, daß die Asche der Plantago-Arten reich an Kalium ist.

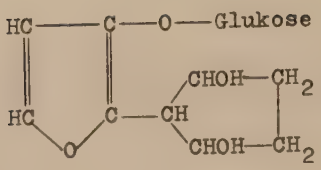
Aucubin und seine Struktur.

Im Jahre 1902 wurde aus den Samen von Aucuba japonica Thunbg. eine kristalline Substanz in größerer Ausbeute von E.BOURQUELOT und H.HÉRISSEY[7] erhalten, die mit Aucubin bezeichnet wurde. Die Autoren erkannten, daß es sich bei dem Aucubin um ein Glykosid handelt, das aus den beiden Komponenten Glukose und einem unbeständigen Aglykon, dem Aucubigenin besteht. Sie gaben eine ausführliche Beschreibung der chemischen Eigenschaften dieser Verbindung. Erstmalig wurde diese Substanz von H.LUDWIG[40,41] aus der Scrophulariaceae Rhinanthus crista galli L. isoliert, der sie mit Rhinanthin bezeichnete. Die Identität von Aucubin mit Rhinanthin stellten M.BRIDEL und M.BRAECKE[9] im Jahre 1922 fest. Später versuchten dann M.BERGMANN und G.MICHALIS[4] die Struktur dieser Verbindung aufzuklären, konnten aber nur die Summenformel ($C_{15}H_{22}O_9 \cdot H_2O$) aufstellen. Daneben gelang es ihnen, das Hexa-acetyl-aucubin herzustellen, die Bromierung des Aucubins durchzuführen und somit die Grundlagen für weitere Arbeiten zu schaffen. 1946 befaßten sich P.KARRER und H.SCHMID[35] mit der Konstitution und kamen dabei zu einer Struktur (Formel I). Aber bald darauf stellte Y.NAKAMURA[47] zwei einander ähnliche Strukturen (Formeln II und III) zur Diskussion, die in ihrem Grundgerüst mit der von KARRER und SCHMID vorgeschlagenen Konstitution übereinstimmen. Diese drei Strukturen waren aber nicht befriedigend, denn das Aucubin muß aufgrund seiner IR.- und UV.-Spektren eine Enoläthergruppierung besitzen und eine konjugierte Anordnung der

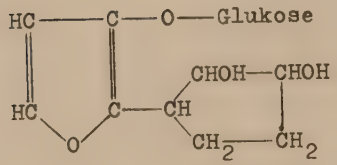
Doppelbindungen erscheint ausgeschlossen. (M.W.WENDT, W.HAEGELE, E.SIMONITSCH und H.SCHMID[68]). Deshalb wurde vor kurzer Zeit das Problem der Konstitutionsaufklärung wieder aufgegriffen (S.FUJISE, H.OBARA und H.UDA[19]; J.GRIMSHAW und H.R.JUNEJA[22]) und eine andere Struktur wurde vorgeschlagen (Formel IV). H.SCHMID und Mitarbeiter[68] sind der Ansicht, daß ein sicherer Entscheid zwischen dieser Struktur und einer weiteren, die sie ebenfalls zur Diskussion stellen, aufgrund der bisherigen Ergebnisse nicht zu fällen ist. (Formel V). Nach den neuen Vorstellungen enthält das Aucubin eine enolische Halbacetal-Struktur, wie sie ebenfalls im Plumierid und verwandten Stoffen vorkommt (O.HALPERN und H.SCHMID[25]).

Von den verschiedenen Autoren wurden folgende Konstanten für das Aucubin angegeben:

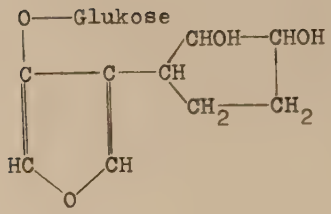
E.BOURQUELOT und H.HÉRISSEY[7]
Schmp. = 180°C $[\alpha]_D^{20}$ = -173,1° (c=2,956)
M.BERGMANN und G.MICHALIS[4]
Schmp. = 181°C $[\alpha]_D^{20}$ = -171,4° (c=?)
P.KARRER und H.SCHMID[35]
Schmp. = 182°C $[\alpha]_D^{20}$ = -162,0° (c=1,988)
J.E.ROMBOUTS und J.LINKS[57]
Schmp. = 180°C $[\alpha]_D^{20}$ = -163,1° (c=1,600)
M.CHASLOT[12]
Schmp. = 182 - 183°C $[\alpha]_D^{20}$ = -165,2° (c=2,066)



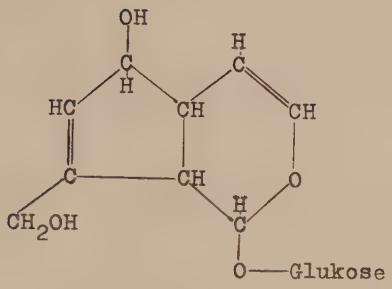
Formel I



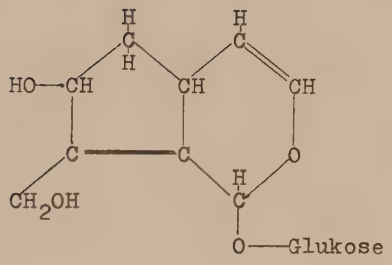
Formel II



Formel III



Formel IV



Formel V

Verwandte Naturstoffe des Aucubins

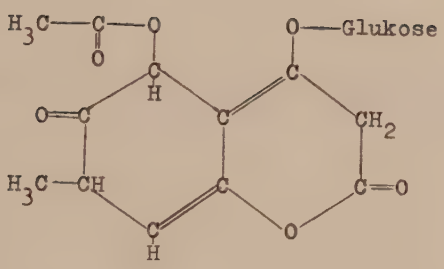
Agnusid ist ein Ester der p-Hydroxybenzoesäure mit dem Aucubin (E.WINDE und R.HÄNSEL[70]). Die p-Hydroxybenzoesäure ist nach neuen Untersuchungen (M.SIRAIT[61]) wahrscheinlich mit dem Aglykon verbunden, jedoch ist noch nicht geklärt, ob die primäre oder die sekundäre Hydroxylgruppe des Aucubigenins verestert ist.

Mit der Konstitution des Asperulosids befaßten sich als erste 1954 L.H.BRIGGS und B.F.CAIN[10], sie stellten eine Struktur auf, die sich völlig von der damals gültigen des Aucubins unterschied. Durch dieses Ergebnis schien es, daß bei den einzelnen Pseudoindikanen verschiedene Grundkörper vorliegen und daß sich das Gemeinsame dieser Stoffe auf einige chemische Eigenschaften (große Säureempfindlichkeit, Polymerisation der Aglyka), die allen Pseudoindikanen gemeinsam sind, beschränkt.

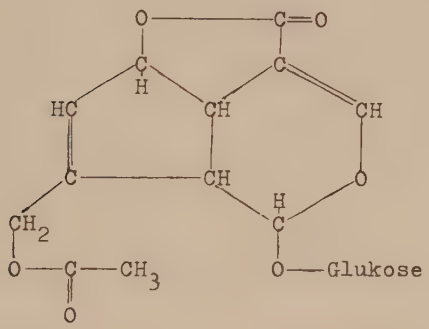
Aufgrund der neuen Ergebnisse über die Konstitution des Aucubins wurde auch die Frage der Struktur des Asperulosids wieder aufgegriffen (J.GRIMSHAW[23], L.H.BRIGGS+). Das Ergebnis dieser Untersuchungen bewies die nahe chemische Verwandtschaft des Asperulosids mit dem Aucubin. Auch die Versuche zur Konstitutionsaufklärung des Catalposids (J.M.BOBBITT, H.SCHMID und T.B.AFRICA++) ergaben Beweise für die engen Beziehungen der Pseudoindikane unter einander, man kann daher heute die Pseudoindikane als eine einheitliche chemische Stoffklasse betrachten.

+) Persönliche Mitteilung von Herrn Prof.L.H.BRIGGS

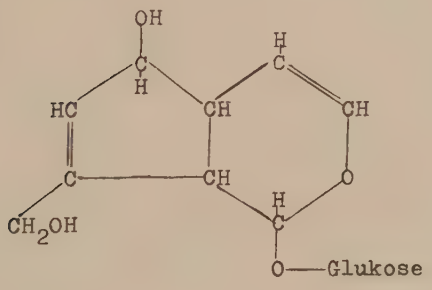
++) Mitteilung von Herrn Prof. J.M.BOBBITT



Asperulosid (L.H.BRIGGS und B.F.CAIN)



Asperulosid (J.GRIMSHAW)



Aucubin

Bisher durchgeführte Untersuchungen über die antibakterielle Wirkung einiger Plantago-Arten.

Nach den Untersuchungen von E.FREERKSEN und R.BÖNICKE[18] weist der Preßsaft der frischen Blätter von Plantago lanceolata antibakterielle Eigenschaften auf. Die Autoren befaßten sich eingehend mit dieser Pflanze und kamen zu folgendem Ergebnis:

1. Der Preßsaft wirkt auf 13 verschiedene Mikroorganismen wachstumshemmend.
2. Das aktive Prinzip ist weitgehend thermostabil.
3. Das aktive Prinzip tritt nach Plantagofütterung an Kaninchen, Schafen, Ziegen und Rindern wieder im Urin der Tiere auf. Hierüber schreiben sie: "Durch die Fütterung wird nicht eine sekundäre, durch andere Faktoren bedingte antibakterielle Aktivität des Urins erzeugt, sondern das durch die Nahrung aufgenommene aktive Prinzip erscheint im Urin wieder." Diese Eigenschaft besitzen nur wenige Wirkstoffe, sodaß die Autoren auf eine eventuelle Anwendung zur Infektionsprophylaxe oder sogar zur Infektionsheilung hinweisen.

Ebenfalls sehr ausführlich hat sich M.FELKOVA[16] mit den antibakteriellen Eigenschaften von Plantago lanceolata befaßt. Sie untersuchte die verschiedenen Entwicklungsstadien im Laufe einer Vegetationsperiode. Die frischen Blätter wurden mit 96-%igem Äthanol und mit physiologischer Kochsalzlösung mazeriert, die Mazerate wurden gegen vier verschiedene Mikroorganismen getestet. Dabei waren die Resultate vom Entwicklungszustand der Pflanzen, vom Testobjekt und vom Extraktionsmittel abhängig und auffällig voneinander verschieden. Die alkoholischen Auszüge waren während der ganzen Zeit gegenüber Staphylococcus aureus wirksam, im Herbst trat eine Wirkungsspitze auf. Dagegen zeigte der mit Kochsalzlösung zubereitete Extrakt nur im Herbst eine Aktivität. Streptococcus betahaemolyticus und Bacillus subtilis wurden nur durch die im Juni hergestellten Extrakte beeinflußt,

gegenüber Escherichia coli konnte keine Hemmwirkung bemerkt werden.

B.I.MONASTYRSKAYA und A.A.PETROPAVLOVSKAYA[45] konnten dagegen keine Wirkung der Plantagoextrakte auf Strepto- und Staphylokokken beobachten. Im Gegensatz hierzu hat J.KLOSA[37] die antibakterielle Wirksamkeit wieder bestätigt, die parallel mit einer Verzögerung des Keimungsbeginns von Samen verläuft. R.L.ROSENFELD und L.J.CHAZANOWITSCH[58] untersuchten eine Anzahl Pflanzen auf ihre bacteriostatischen und bactericiden Eigenschaften. Unter diesen Drogen befand sich auch das Kraut von Plantago lanceolata, das nach dem Trocknen seine antibakteriellen Fähigkeiten verloren hatte. ("flüchtige Phytoncide". Der Begriff eines Phytoncides wurde von B.P.TOKIN[63] aufgestellt, der darunter antibakteriell wirksame Substanzen aus höheren Pflanzen versteht.) F.BOAS[5] beobachtete bei seinen Unterwasserproben folgendes: Die frischen Blätter der Plantago-Arten zögern die Fäulnis anderer Pflanzen und Pflanzenteile im Wasser heraus.

Eine andere aucubinhaltige Arzneipflanze, die Cornaceae Aucuba japonica Thunbg. wirkt ebenfalls auf verschiedene Mikroorganismen wachstumshemmend. (A.G.WINTER und L.WILLEKE[70]). J.E.ROMBOUTS und J.LINKS[57] untersuchten diese Droge und konnten das aktive Prinzip aufgrund folgender Beobachtung auffinden: Die wässerige Aufkochung der Blätter besaß keine antibakteriellen Eigenschaften mehr. Nach Zugabe einiger ml des frischen Preßsaftes stellte sich die gesamte Wirkung wieder ein. Das wirksame Prinzip mußte nach Auffassung der Autoren als unwirksame Vorstufe in der Pflanze vorliegen und durch Einwirken eines Fermentes aktiviert werden. Sie behandelten reines Aucubin mit einem spezifischen ß-glukosidspaltenden Ferment, das sie aus den Blättern von Aucuba japonica in Anlehnung an die Untersuchungen von S.HATTORI und Y.KURIHARA[27] darstellten, und testeten die Lösung gegen einige Mikroorganismen aus. Als wirksam erwies sich die Lösung gegenüber Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus

subtilis und Penicillium italicum. Die Autoren geben das AUCUBIGENIN als das aktive Prinzip der Blätter von Aucuba japonica an.

H A U P T T E I L

I. Phytochemische Untersuchungen

a) Voruntersuchungen der Plantagoextrakte mit Hilfe der Papierchromatographie.

Um einen Überblick über die verschiedenen Pflanzeninhaltsstoffe zu erhalten, wurden die methanolischen Blattextrakte von Plantago lanceolata und P.media papierchromatographisch untersucht. Im Laufmittel Butanol-Methanol-Wasser (4:1:5, v/v/v) zeigte das Chromatogramm nach dem Besprühen mit verschiedenen Reagenzien folgendes Bild (Tabelle I):

Tabelle I

(R_f-Werte und Farbreaktionen der Flecken des Chromatogramms von Plantago lanceolata L.)

Behandlungsmethode	Farbe der Flecke bei R_f					
	0,16	0,19	0,21	0,24	0,35	0,40
Tageslicht unbehandelt	--	--	--	--	--	--
Reag. I	g	--	--	--	--	bgr
Reag. II	g	--	--	--	--	bgr
Reag. III	g	--	--	--	--	g
Reag. IV	g	--	--	g	--	g
Reag. V	g	g	rbr	g	br	rbr
Reag. VI	--	--	--	--	br	--
UV.-Licht unbehandelt	gr	r	b	gr	--	b
NH_3-Dämpfe	g	Gr	bGr	grGr	--	gGr
Reag. III	gbr	--	--	--	--	gGr

g = gelb, b = blau, r = rötlich, br = braun, gr = grau, Gr = grün, rbr = rotbraun, bgr = blaugrau, gbr = gelbbraun, bGr = blaugrün, gGr = gelbgrün, grGr = graugrün

Charakterisierung der einzelnen Flecke.

Der Fleck bei dem R_f-Wert 0,16 ist seinem Verhalten nach ein Flavonoid, wahrscheinlich ein Flavonol, da mit Aluminiumchlorid und Zirkonoxychlorid eine Gelbfärbung auftritt und die Zitronensäurereaktion (R.HÄNSEL[26]) positiv ausfällt. Zur näheren Charakterisierung wurden Papierchromatogramme mit 15 %iger und 60 %iger Essigsäure angefertigt, um eventuell durch Vergleichssubstanzen diese Verbindung zu identifizieren. Die R_f-Werte in diesen Laufmitteln waren 0,18 und 0,62. Die Verbindung konnte jedoch nicht identifiziert werden. Genaue Untersuchungen über die Substanz wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da die Verbindung nur in geringer Konzentration in der Pflanze enthalten ist und daher für die antibakteriellen Eigenschaften der Plantago-Arten nicht von Bedeutung sein kann. (Es gibt zwar einige Flavonole, die auf das Wachstum einiger Mikroorganismen hemmend einwirken, jedoch muß die Konzentration wesentlich höher sein. Als wirksames Flavonol ist das Quercetin bekannt (J.NAGHSKI, M.J.COPLEY, J.F.COUCH[46]).

Bei der Verbindung vom R_f= 0,40 handelt es sich um die im Pflanzenreich weit verbreitete Chlorogensäure. Durch Vergleichschromatogramme mit authentischer Chlorogensäure in verschiedenen Laufmitteln wurde die Verbindung identifiziert. Einen weiteren Beweis für das Vorliegen von Chlorogensäure erbrachte die Absorption des alkoholischen Fleckeneluates (Methode nach JOHNSON und SCHAAL[34]).

Bei dem Fleck vom R_f= 0,35 handelt es sich um das Aucubin, das durch Vergleich mit authentischen Aucubin identifiziert wird. Die nach der Säurebehandlung auftretende braunschwarze Färbung charakterisiert allgemein die Pseudoindikane.

Über die anderen Flecken lassen sich keine sicheren Angaben machen; die einzelnen Verbindungen werden durch die Reagenzien zu schwach und nur uncharakteristisch gefärbt.

Werden die Chromatogramme der methanolischen Blattextrakte

von Plantago lanceolata und Plantago media miteinander verglichen, so ist kein Unterschied zu erkennen; die beiden Plantago-Arten enthalten offenbar die gleichen phenolischen Inhaltsstoffe.

b) Isolierung von Aucubin aus den Blättern von Plantago media L.

Zum Nachweis von Aucubin wurde ein Reagenz verwendet, das nach dem Vorschlag von A.R.TRIM und R.HILL[64] aus 10 Teilen Essigsäure, 0,5 Teilen konzentrierter Salzsäure und einem Teil einer 0,2 %igen Kupfersulfatlösung hergestellt wurde. Es wurde in dieser Arbeit als Reagenz A bezeichnet.

Die frisch gesammelten Blätter von Plantago media wurden in Wasser unter Zusatz von Calciumkarbonat ausgekocht, heiß abfiltriert und ausgepreßt. Der wässerige Extrakt wurde unter vermindertem Druck eingeengt und mit Petroläther ausgeschüttelt. Die Begleitstoffe wurden mit einer 20 %igen Bleiazetatlösung ausgefällt, das überschüssige Blei durch Einleiten von Schwefelwasserstoff entfernt. Die wässerige Aucubinlösung wurde zur Trockne eingeengt, im Vakuumexsikkator vollständig getrocknet und in Anlehnung an die Methode von P.KARRER und H.SCHMID[35] azetyliert. Das Aucubinhexaacetat wurde mit Bariumhydroxydlösung verseift. Das Aucubin konnte darauf durch Umkristallisieren aus Essigester-Methanol (85:15, v/v) und heißem Äthanol rein erhalten werden.

Schmp. = 181,5°C

$[\alpha]_D^{20}$ = -163,0° (c = 1,6005, Wasser)

c) Isolierung von Aucubin aus den Samen von Plantago lanceolata L.

Weiteres Aucubin wurde in Anlehnung an die Isolierungsmethode von P.KARRER und H.SCHMID[35] aus den Samen von Plantago lanceolata gewonnen. Die Samen wurden mit Methanol

extrahiert, das Lösungsmittel wurde verjagt und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Die Begleitstoffe wurden wieder mit Bleiazetatlösung ausgefällt, das überschüssige Blei durch Einleiten von Schwefelwasserstoff entfernt. Der Extrakt wurde zur Trockene eingeengt, mit gereinigtem Seesand verrieben und im Soxhlet-Apparat mit Aceton-Äthanol-Wasser (94:5:1, v/v/v) extrahiert. Nach dem Einengen der Lösung kristallisierte das Aucubin aus, das durch Umkristallisieren aus Äthanol gereinigt wurde.

Weiße Rosetten Schmp. = 181 - 182°C.

d) Photometrische Bestimmung von Aucubin.

Die Pseudoindikane ergeben in wässerigen Lösungen beim Erwärmen mit Mineralsäuren und Essigsäure eine blaue bis blaugrüne Verfärbung. Diese Farbreaktion wurde schon öfters verwendet, um Gehaltsbestimmungen der Pseudoindikane in Drogen photometrisch durchzuführen (H.GUSEVA[24], M.CHASLOT[12]; G.DUSINSKY und M.TYLLOVA[15]). Die Autoren adsorbierten dabei das Aucubin an Aktivkohle, eluierten mit Äthanol und konnten anschließend den Gehalt an Aucubin in der reinen Lösung bestimmen. Es wurde von mir eine Methode ausgearbeitet, die es ermöglicht, den Gehalt an Aucubin in Pflanzensäften und -extrakten zu bestimmen, nachdem die Pigmente an Aluminiumoxyd adsorbiert wurden. Der über Al_2O_3 filtrierte aucubinhaltige Extrakt wurde mit Eisessig-25 %iger Salzsäure (98 + 2) erhitzt, die Extinktion der blauen Lösung bei λ = 615 mμ gemessen. An Hand einer Standardeichkurve ließ sich der Gehalt ersehen.

Die Messungen ergaben folgende Ergebnisse:
Samen von Plantago lanceolata 0,95 % Aucubin, Herba Plantaginis lanceolatae Erg.Buch 1,8 % Aucubin und die frischen Blätter von Plantago media 0,6 % Aucubin.

e) Versuche zur Gewinnung und Papierchromatographie von Aucubigenin.

Aucubigenin läßt sich nicht ohne Schwierigkeiten darstellen, da das Aglykon schnell ein braunschwarzes unlösliches Polymerisat bildet. Unter Einwirkung von ß-Glukosidase auf eine wässerige Lösung des Glykosides bei einer Temperatur von 37°C - bei dieser Temperatur entfaltet das Ferment seine optimale Aktivität - entsteht nach einigen Stunden ein dunkelgefärbter Niederschlag. Läßt man dagegen das Ferment im Kühlschrank (6°) auf eine Aucubinlösung einwirken, so bildet sich nach einigen Tagen ein weißer flockiger Niederschlag, der sich nur langsam im Laufe mehrerer Wochen braun färbte. Wurde jedoch der Niederschlag abfiltriert, so entstand sofort das Polymerisat. Daher ließ sich die enzymatische Spaltung des Glykosides zum Aglykon nur papierchromatographisch nachweisen.

Im Laufmittel Butanol-Methanol-Wasser (4:1:5 , v/v/v) wurden nach Besprühen mit einer Trichloressigsäurelösung auf dem Chromatogramm drei dunkle Flecke sichtbar:

Polymerisat	R_f= 0,0
Aucubin	R_f= 0,35
Aucubigenin	R_f= 0,75

Die Verbindung vom R_f= 0,75 wird in der Literatur (R.PARIS und M. CHASLOT[50]; M.JANOT, E.SAIAS und M.FOUCHER[33]) als Aucubigenin bezeichnet. Es ist allerdings bis jetzt noch nicht bewiesen worden, ob es sich wirklich um das hypothetische Aglykon handelt, oder ob die Verbindung ein Zwischenprodukt zur Polymerisation darstellt.

Die antibakterielle Aktivität des Wegerichs wird durch das Hydrolyseprodukt des Aucubins - vermutlich durch das Aucubigenin - hervorgerufen. Daher sollte festgestellt werden, ob in der frischen Pflanze Aucubigenin enthalten ist. Papierchromatographisch ließ sich stets eine geringe Menge Aucubigenin in dem Preßsaft der Blätter nachweisen. Aus dieser Untersuchung läßt sich

natürlich nicht erkennen, ob das Aucubigenin in der Pflanze genuin vorkommt, oder ob es bei der Aufbereitung aus dem Aucubin und den in der Pflanze enthaltenden glukosidspaltenden Fermenten gebildet wird.

f) Isolierung und Charakterisierung eines Triterpens: der Ursolsäure.

Aufgrund der verschiedenen Löslichkeit der Pflanzeninhaltsstoffe in lipophilen und hydrophilen Medien lassen sich die Substanzen durch Extrahieren mit verschiedenen Lösungsmitteln trennen. Dieses Verfahren wurde angewendet, um festzustellen, ob im Plantago weitere, bisher nicht bekannte antibakterielle Verbindungen enthalten sind. Das getrocknete Kraut von Plantago lanceolata wurde in einem Soxhlet-Apparat mit folgenden Lösungsmitteln extrahiert: Petroläther, Äther, Essigester und Methanol.

Aus dem Ätherauszug wurde eine kristalline Substanz erhalten, die eine positive LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion zeigte. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus heißem 96 %igen Äthanol schmolz die Substanz bei 275 - 278°C. Die Vermutung, daß es sich bei den Kristallen um die Ursolsäure handelt, wurde durch Vergleich der isolierten Substanz mit authentischer Ursolsäure bewiesen. Ein Gemisch beider Substanzen zeigte keine Schmelzpunktdepression, die Extinktionskurven stimmen nach Lage und Höhe der Banden überein und auf dem Dünnschichtchromatogramm haben beide Substanzen den gleichen R_f-Wert und den gleichen Farbton nach Besprühen mit Antimontrichlorid in Chloroform.

Absorptionsmaxima 1.) $\lambda_{max.}$ = 251 mμ
2.) $\lambda_{max.}$ = 314 mμ
Absorptionsminima $\lambda_{min.}$ = 269 mμ

R_f = 0,9 (Methanol-Aceton-Chloroform, 5/2/75, v/v/v, Kieselgel G MERCK)

g) Papierchromatographische Untersuchungen des Wurzelextraktes von Veronica virginica L.

Die Wurzeln des virginischen Ehrenpreises enthalten neben Aucubin ein weiteres Pseudoindikan, das im Laufmittel Butanol-Methanol-Wasser (4:1:5, v/v/v) den gleichen R_f-Wert wie Aucubigenin aufweist. Nach den Untersuchungen von R.PARIS und M.CHASLOT[50] kommen in verschiedenen Scrophulariaceen Aucubin und Aucubigenin gemeinsam vor. Ich vermutete daher, daß das zweite Pseudoindikan mit Aucubigenin identisch ist. Da aber das Aglykon sehr instabil ist und die Droge schon jahrelang lagerte, konnte nur ein Stabilisator die Polymerisation des Aucubigenins verhindern. Papierchromatographische Prüfungen des Extraktes (Laufmittel:Essigsäure-Wasser, 15:85, v/v) zeigten eine Substanz an, die sofort in der Kälte ammoniakalische Silbernitratlösung reduzierte und phenolische Eigenschaften aufwies. Polyphenole besitzen nun die Fähigkeit, eine Polymerisation leicht oxydabler Substanzen zu verhindern (W.HÜCKEL[30]). Ich nahm daher an, daß die reduzierende Verbindung die Polymerisation des Aucubigenins verhindert. Durch Trennung an einer Polyamidsäule ließ sich die Substanz reinigen und anreichern. Stabilisierungsversuche mit dieser Verbindung verliefen jedoch erfolglos, die Polymerisation des Aglykons wurde nicht verhindert.

Parallel verlaufende papierchromatographische Untersuchungen erbrachten jedoch den Beweis, daß das zweite Pseudoindikan der Leptandrawurzel nicht mit Aucubigenin identisch ist. In verschiedenen Lösungsmittelsystemen haben beide Substanzen eine verschiedene Laufgeschwindigkeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Pseudoindikan nur bakteriologischen Prüfungen unterzogen; eine chemische Bearbeitung der Verbindung soll späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

II. Bakteriologische Untersuchungen

Die Plantago-Arten enthalten, wie durch die vorliegenden Untersuchungen der verschiedenen Autoren sichergestellt wurde, antibakteriell wirksame Inhaltsstoffe, deren chemische Natur aber noch nicht geklärt ist. Nun wurde in diesen Arten das Glukosid Aucubin als wesentlicher Inhaltsstoff aufgefunden. Bei der Cornaceae Aucuba japonica wurde das Aucubigenin, also das Aglykon des Aucubins als Substanz von Wirkstoffcharakter erkannt. Ich ging bei meinen Untersuchungen von der Annahme aus, daß die Aktivität der Plantago-Arten vollständig oder auch nur teilweise durch den gleichen Wirkstoff hervorgerufen wird, obwohl bisher noch kein Aucubigenin in diesen Pflanzen nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grunde wurde zuerst reines Aucubin in wässeriger Lösung unter Einwirkung von ß-Glukosidase hydrolysiert, die Hydrolyselösung gegen verschiedene Bakterienstämme ausgetestet. Daneben wurden der Frischpflanzenpreßsaft und der wässerige Extrakt des getrockneten Krautes eingehenden Prüfungen unterzogen und miteinander verglichen. Außerdem wurde aucubinfreier Preßsaft getestet. Da mir die Ergebnisse der Tierfütterungsversuche von E.FREERKSEN und R.BÖNICKE[18] bemerkenswert erschienen, denn das Aucubigenin ist sehr instabil und dadurch nur über kurze Zeit beständig, habe ich diese Untersuchungen reproduziert. Um einige genaue Aussagen über die antibakteriellen Eigenschaften der Stoffgruppe der Pseudoindikane geben zu können, habe ich abschließend auch das Aucubinderivat Agnusid, das Asperulosid und ein unbekanntes Pseudoindikan der Scrophulariaceae Veronica virginica sowie die entsprechenden Hydrolyseprodukte bakteriologischen Versuchen unterzogen.

a) Teste mit einer wässerigen Lösung des Aucubinhydrolysates.

Für diese Untersuchungen wurde zuerst eine 2 %ige

Aucubinlösung in sterilem Wasser verwendet, zu der einige Kristalle ß-Glukosidase+) gegeben wurden. Jeweils 0,1 ml dieser Lösung wurden im Lochtestverfahren gegen 20 verschiedene Bakterienstämme getestet.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind aus der nachfolgenden Tabelle II zu ersehen. In den tabellarischen Übersichten sind die Hemmungshöfe wie folgt angegeben worden: + = Hofdurchmesser bis einschließlich 15 mm, ++ = Hofdurchmesser von 15,1 bis 20,0 mm, +++ = Durchmesser von 20,1 bis 25,0 mm und ++++ = Hofdurchmesser über 25 mm. Hemmungshöfe, die nur eine schwache Trübung aufzuweisen hatten, wurden mit (+) bezeichnet.

Wie aus Tabelle II hervorgeht, zeigt das Aucubinhydrolysat eine antibakterielle Wirkung gegen sämtliche getesteten Keime. Eine spezifische Wirksamkeit auf eine der beiden Gruppen - grampositive und gramnegative Bakterien - wurde nicht beobachtet. Starke Hemmeigenschaften entfaltet die aktive Substanz gegenüber Staphylococcus aureus, Proteus vulgare, Bacillus subtilis und cereus sowie Mycobacterium phlei, während das Wachstum von Klebsiella pneumoniae, verschiedenen Salmonellen und Streptokokken weniger beeinträchtigt wird.

Um mit Sicherheit sagen zu können, daß dem Hydrolyseprodukt des Aucubins die Hemmeigenschaft zuzusprechen ist, wurden die gleichen Versuchsreihen mit jeweils einer 2 %igen Aucubinlösung und mit einer wässerigen ß-Glukosidaselösung durchgeführt. Beide Lösungen zeigten nicht den geringsten Einfluß auf das Wachstum der Bakterien, das Hydrolyseprodukt besitzt daher die inhibitorischen Eigenschaften. Ob nun das primär entstehende Aucubigenin oder ein Sekundärprodukt der aktive Faktor ist, läßt sich aufgrund der Versuche nicht entscheiden.

+) hergestellt von der Fa. C.ROTH, Karlsruhe

Tabelle II

(Wirkung einer 2 %igen wässerigen Aucubin-ß-Glukosidase-Lösung auf verschiedene Mikroorganismen.)

Teststamm	Wirkung	Durchmesser
Proteus vulgare OX 19	+++	24,5 mm
Klebsiella pneumoniae	+	13,5 mm
Shigella sonnei	++	16,2 mm
Shigella paradysenteriae	++	17,0 mm
Salmonella typhi	++	16,5 mm
Salmonella paratyphi B	++	16,0 mm
Salmonella java	++	19,5 mm
Salmonella enteritidis	++	15,8 mm
Aerobacter aerogenes	++	17,4 mm
Escherichia coli	++	16,3 mm
Serratia marcescens	++	17,0 mm
Pseudomonas pyocyanea	++	18,6 mm
Mycobacterium phlei	+++	21,5 mm
Staphylococcus aureus	++++	37,4 mm
Diplococcus pneumoniae	+++	20,6 mm
Streptococcus viridans	++	16,1 mm
Streptococcus haemolyticus	+	15,0 mm
Streptococcus pyogenes	++	16,4 mm
Bacillus subtilis	+++	23,7 mm
Bacillus cereus	+++	22,9 mm

In der Hydrolyselösung wurden papierchromatographisch folgende Bestandteile nachgewiesen: Aucubin und zwei seiner Hydrolyseprodukte (Aucubigenin nach R.PARIS und M.CHASLOT[50] und das Polymerisat). Aucubin und das Polymerisat sind unwirksam. Es ist daher zu vermuten, daß das "Aucubigenin" die Wirkung hervorruft.

Es war nun notwendig, die Konzentration zu bestimmen, bei der das Hydrolyseprodukt gerade noch eine feststellbare Wirkung besitzt. Im allgemeinen werden Untersuchungen dieser Art im Röhrchenverdünnungstest durchgeführt. Da das Aglykon aber bei 37°C schon nach kurzer Zeit in das braungefärbte Polymerisat umgewandelt wird und dadurch die Bouillon trübt, konnte diese Methode hier nicht angewendet werden. Ich stellte mir deshalb eine Verdünnungsreihe des Aucubins in sterilem Wasser her, fügte einige Kristalle ß-Glukosidase hinzu und arbeitete mit diesen Lösungen ebenfalls nach dem Lochtestverfahren. Als Versuchsmikroorganismus diente Staphylococcus aureus, der sich gegenüber der Lösung als sehr empfindlich erwiesen hatte.

Das Ergebnis dieses Versuches ist aus der Tabelle III zu ersehen.

Die antibakterielle Wirkung der Substanz ist gegenüber Staphylococcus aureus recht bedeutend. Noch 0,1 ml einer 0,1 %igen Ausgangslösung, das sind 0,053 mg der aktiven Substanz (berechnet als Aucubigenin), weisen einen deutlichen Hemmungshof von 13,1 mm Durchmesser auf. Die 0,05 %ige Lösung zeigte keine sichere Wirkung mehr, der kleine Hof war nicht völlig klar.

Vergleichsweise wurde eine wässerige Penicillinlösung gegen den gleichen Bakterienstamm ausgetestet. Das Penicillin wurde in sterilem Wasser aufgeschwemmt und absteigend verdünnt. Jeweils 0,1 ml wurden im auxenographischen Verfahren geprüft. Ich verwendete hierzu "Tardocillin" BAYER und kam zu folgenden

Ergebnissen (Tabelle IV).

Tabelle III

(Wirkung verschiedener Konzentrationen des Hydrolysates gegenüber Staphylococcus aureus)

Konz. der Aucubin-ß-Glukosidase-Lösung	Konz. der aktiven Substanz+)	Wirkung	Hof-Ø
2 %	1,06 %	++++	37,4 mm
1 %	0,53 %	++++	31,6 mm
0,5 %	0,25 %	++++	26,1 mm
0,25 %	0,13 %	++	18,7 mm
0,20 %	0,10 %	+	15,0 mm
0,10 %	0,05 %	+	13,1 mm
0,05 %	0,026%	(+)	5,0 mm

+) berechnet als Aucubigenin

Tabelle IV

(Wirkung von Penicillin auf Staphylococcus aureus)

Penicill.in Einh.	Wirkung	Hof-Ø
600 i.E.	++++	33 mm
120 i.E.	++++	30 mm
60 i.E.	++++	28 mm
12 i.E.	+++	24 mm
6 i.E.	+++	21 mm
1,2 i.E.	++	19 mm
0,6 i.E.	+	15 mm

0,1 ml einer 0,2 %igen Aucubin-ß-Glukosidase-Lösung weisen gegenüber Staphylococcus aureus etwa den gleichen Hemmungshof wie 0,6 i.E. Penicillin auf. Getestet wurde die Aktivität beider Substanzen auf verschiedenen Platten gleicher Schichtdicke unter den gleichen äußeren Bedingungen.

Eine weitere Frage konnte geklärt werden. Es sollte festgestellt werden, ob der Wirkstoff nur bacteriostatische oder gar bactericide Fähigkeiten aufweist. Zu diesem Zweck wurden 10 ml einer 2 %igen Aucubin-ß-Glukosidase-Lösung mit der gleichen Menge steriler Nährlösung gemischt. Beimpft wurde diese Mischung mit 0,1 ml einer 24-stündigen flüssigen Kultur des entsprechenden Testbakteriums. Nun wurden die beimpften Röhrchen in den Brutschrank (Bebrütungstemperatur 37°C) gestellt und nach jeweils 12 und 24 Stunden wurden Subkulturen angelegt. Diese erwiesen sich bei Staphylococcus aureus und Bacillus subtilis als steril. Gegenüber Escherichia coli und Streptococcus haemolyticus ließ sich keine bactericide Wirkung feststellen.

Aus den vorliegenden Versuchen ist folgendes zu ersehen: Das Aucubinhydrolysat wirkt verschieden stark auf einzelne Mikroorganismenspezies. Das Aucubinhydrolysat weist bei einem Teil der Stämme nur inhibitorische, bei dem anderen Teil aber bactericide Fähigkeiten auf.

b) Teste mit den Frischpflanzenpreßsäften aus Plantago lanceolata und P.media.

Die Preßsäfte der frischen Blätter von Plantago lanceolata und P.media wurden auxenographisch gegen die 20 verschiedenen Bakterienstämme getestet. Die Versuche wurden von Anfang Juni bis Ende August 1960, also zur Blütezeit der Pflanzen durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen Va und Vb zusammengefaßt worden.

Tabelle Va

(Wirkung des Preßsaftes der frischen Blätter von Plantago lanceolata auf verschiedene Mikroorganismenspezies.)

Teststamm	Wirkung	Durchmesser
Proteus vulgare OX 19	+++	21,8 mm
Klebsiella pneumoniae	+	12,1 mm
Shigella sonnei	+	15,0 mm
Shigella paradysenteriae	++	15,9 mm
Salmonella typhi	++	15,7 mm
Salmonella paratyphi B	++	15,8 mm
Salmonella java	++	17,6 mm
Salmonella enteritidis	+	14,8 mm
Aerobacter aerogenes	++	16,0 mm
Escherichia coli	+	13,4 mm
Serratia marcescens	++	16,2 mm
Pseudomonas pyocyaneum	++	15,1 mm
Mycobacterium phlei	+++	20,4 mm
Staphylococcus aureus	++++	27,6 mm
Diplococcus pneumoniae	++	19,5 mm
Streptococcus viridans	+	13,7 mm
Streptococcus haemolyticus	+	12,3 mm
Streptococcus pyogenes	+	12,1 mm
Bacillus subtilis	+++	20,4 mm
Bacillus cereus	+++	20,5 mm

Tabelle Vb

(Wirkung des Preßsaftes der frischen Blätter von Plantago media auf verschiedene Mikroorganismenspezies.)

Teststamm	Wirkung	Durchmesser
Proteus vulgare OX 19	+++	20,4 mm
Klebsiella pneumoniae	+	11,9 mm
Shigella sonnei	++	15,3 mm
Shigella paradysenteriae	++	16,8 mm
Salmonella typhi	++	15,9 mm
Salmonella paratyphi B	++	17,0 mm
Salmonella java	++	17,7 mm
Salmonella enteritidis	+	15,0 mm
Aerobacter aerogenes	++	16,1 mm
Escherichia coli	+	14,1 mm
Serratia marcescens	++	17,2 mm
Pseudomonas pyocyaneum	++	15,1 mm
Mycobacterium phlei	+++	21,0 mm
Staphylococcus aureus	++++	28,8 mm
Diplococcus pneumoniae	+++	20,3 mm
Streptococcus viridans	+	12,5 mm
Streptococcus haemolyticus	+	12,5 mm
Streptococcus pyogenes	+	13,0 mm
Bacillus subtilis	+++	20,4 mm
Bacillus cereus	+++	20,1 mm

Wie aus den Tabellen Va und Vb ersichtlich ist, wirkten die Frischpflanzenpreßsäfte der beiden Wegerich-arten gegen sämtliche getesteten Bakterien wachstumshemmend. Dabei wies der Saft von Plantago media eine etwas stärkere Aktivität als der Saft von Plantago lanceolata auf. Aus den Versuchen war zu ersehen, daß die Pflanzen während der Blütezeit, also von Anfang Juni bis Ende August gesammelt werden müssen; Pflanzen, die schon in früherer Jahreszeit gesammelt wurden, hatten eine wesentlich geringere Aktivität, teilweise war überhaupt kein Einfluß mehr zu erkennen. In diesen Preßsäften ließen sich auch nur sehr geringe Mengen von Aucubin nachweisen.

Es war wichtig zu klären, ob das Aucubinhydrolysat das einzige aktive Prinzip von Plantago lanceolata und P. media ist, oder ob noch andere Inhaltsstoffe einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum der Bakterien ausüben. Durch die phytochemischen Untersuchungen wurde bewiesen, daß die Blätter von Plantago lanceolata Chlorogensäure und ein nicht näher charakterisiertes Flavonoid enthalten. Beide Substanzen sind aber nur in geringer Konzentration in der Pflanze enthalten; es konnte kein wachstumshemmender Einfluß der beiden Verbindungen auf verschiedene Bakterien bemerkt werden. Der Beweis wurde durch folgenden Versuch erbracht: Der Frischpflanzenpreßsaft wurde einige Stunden lang bei Laboratoriumstemperatur stehen gelassen. Die glukosidspaltenden Fermente hydrolysierten das Glukosid, das Aglykon polymerisierte und wurde abfiltriert. Der Saft wurde nun mit Reagenz A (s.S. 28) erhitzt, um festzustellen, ob das gesamte Aucubin entfernt werden konnte. Der aucubinfreie Saft wurde dann gegen die gleichen Stämme ausgetestet. Dabei ließ sich nicht die geringste Aktivität mehr beobachten. Somit ist auch diese Frage beantwortet: Das Aucubinhydrolysat ist das einzige wirksame antibakterielle Prinzip der beiden untersuchten Plantago-Arten.

c) Teste mit der Handelsware "Herba Plantaginis lanceolatae Erg.-Buch 6

Da im Ergänzungsbuch 6 zum DAB 6 die beiden Artikel Herba Plantaginis lanceolatae und Herba Plantaginis majoris aufgeführt sind, wurde untersucht, ob beim Trocknen die wesentliche antibakterielle Eigenschaft der Droge erhalten bleibt. L.J.ROSENFELD und R.L.CHAZANOWITSCH[58] kamen bei ihren Untersuchungen zu einem negativen Ergebnis. Die verwendete trockene Plantagodroge hatte die antimikrobiellen Fähigkeiten vollständig verloren. Deshalb bezeichneten sie den Wirkstoff als flüchtiges Phytoncid. In den wässerigen Auszügen der von mir untersuchten Droge konnte ich mit Hilfe von Reagenz A (s.S. 28) Aucubin nachweisen. Eine wässerige Aufkochung und ein kaltbereitetes Mazerat wurden daher jeweils gegen die gleichen 20 Bakterienstämme getestet.

Im auxenographischen Test zeigte die Aufkochung keinen Einfluß auf das Wachstum der Bakterien. Wurde jedoch etwas ß-Glukosidase hinzugefügt, so stellte sich die antibakterielle Aktivität ein. Dagegen wirkt die Mazeration ohne Zusatz von ß-Glukosidase. Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen sind in den Tabellen VIa und VIb zusammengefaßt.

Werden die Tabellen Va und VIa (Frischpflanze und Trockendroge von Plantago lanceolata) miteinander verglichen, so ist zu sehen, daß bei der untersuchten getrockneten Droge kein wesentlicher Wirkungsverlust eingetreten ist. Ich verwendete zwei verschiedene Handelswaren, die Ergebnisse der beiden Sorten stimmten im Wesentlichen überein.

Tabelle VIa

(Wirkung der wässerigen Aufkochung des getrockneten Krautes von Plantago lanceolata auf verschiedene Mikroorganismenspezies+))

Teststamm	Wirkung	Durchmesser
Proteus vulgare OX 19	+++	20,5 mm
Klebsiella pneumoniae	+	12,0 mm
Shigella sonnei	++	15,5 mm
Shigella paradysenteriae	++	15,6 mm
Salmonella typhi	++	15,9 mm
Salmonella paratyphi B	++	16,1 mm
Salmonella java	++	16,9 mm
Salmonella enteritidis	+	13,9 mm
Aerobacter aerogenes	++	15,8 mm
Escherichia coli	+	13,5 mm
Serratia marcescens	++	16,3 mm
Pseudomonas pyocyaneum	++	15,4 mm
Mycobacterium phlei	+++	21,9 mm
Staphylococcus aureus	++++	29,0 mm
Diplococcus pneumoniae	++	18,8 mm
Streptococcus haemolyt.	+	12,6 mm
Streptococcus viridans	+	12,9 mm
Streptococcus pyogenes	+	13,1 mm
Bacillus subtilis	+++	20,1 mm
Bacillus cereus	+++	19,9 mm

+) Der Aufkochung wurden einige Kristalle ß-Glukosidase zugesetzt.

Tabelle VIb

(Wirkung der wässerigen Kaltmazeration des getrockneten Krautes von Plantago lanceolata auf verschiedene Mikroorganismenspezies+))

Teststamm	Wirkung	Durchmesser
Proteus vulgare OX 19	++	16,9 mm
Klebsiella pneumoniae	+	8,1 mm
Shigella sonnei	+	11,5 mm
Shigella paradysenteriae	+	11,7 mm
Salmonella typhi	+	12,0 mm
Salmonella paratyphi B	+	12,5 mm
Salmonella java	+	13,1 mm
Salmonella enteritidis	+	10,3 mm
Aerobacter aerogenes	+	12,6 mm
Escherichia coli	+	10,8 mm
Serratia marcescens	+	13,5 mm
Pseudomonas pyocyaneum	+	11,2 mm
Mycobacterium phlei	++	16,9 mm
Staphylococcus aureus	+++	22,7 mm
Diplococcus pneumoniae	+	14,7 mm
Streptococcus viridans	+	9,4 mm
Streptococcus haemolyticus	+	8,8 mm
Streptococcus pyogenes	+	9,9 mm
Bacillus subtilis	++	16,7 mm
Bacillus cereus	++	16,6 mm

+) Die Teste wurden ohne Zusatz von ß-Glukosidase durchgeführt.

d) Bestimmung der Wirkungsgrenze von Chlorogensäure.

Da in den Blättern von Plantago lanceolata Chlorogensäure nachgewiesen wurde, sollte im Anschluß an die vorigen Untersuchungen die geringste Konzentration der Chlorogensäure ermittelt werden, bei der sie noch eine meßbare antibakterielle Wirkung aufweist. Die Chlorogensäure ist das Depsid aus Kaffeesäure und Chinasäure. Da die Kaffeesäure (3,4-Dioxyzimtsäure) und einige ihrer Derivate die schwache antibakterielle Wirkung zahlreicher Pflanzen hervorruft (nach H.WAGNER[66]), war diese Bestimmung notwendig. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe der Chlorogensäure in sterilem Wasser hergestellt, die Aktivität wurde im Auxenogramm gegen Staphylococcus aureus bestimmt.

Das Ergebnis zeigt die Tabelle VII. Die Chlorogensäure wirkt also erst in wesentlich höherer Konzentration, als sie im Plantago enthalten ist.

Tabelle VII

(Bestimmung der Wirkungsgrenze von Chlorogensäure gegen Staphylococcus aureus.)

Konzentration	Wirkung	Durchmesser
4 %	+	11 mm
2 %	+	8 mm
1 %	+	5 mm
0,5 %	(+)	4 mm

e) Teste mit Kaninchenurin nach Fütterung mit den Blättern von Plantago media.

E.FREERKSEN und R.BÖNICKE[18] kamen bei ihren Tierfütterungsversuchen mit Plantago zu folgendem Ergebnis:

Das aktive Prinzip erscheint nach Verfütterung der Plantagoblätter an verschiedene Tiere wieder quantitativ im Urin der Tiere. Ich hielt es für unwahrscheinlich, daß das instabile Hydrolyseprodukt im Urin erhalten bleibt. Deshalb habe ich diese Versuche reproduziert und außerdem versucht, Aucubigenin im Kaninchenurin nachzuweisen.

Vier Kaninchen wurden ausschließlich mit frischen Plantagoblättern gefüttert; der Urin wurde mit einem Katheter entnommen und im Auxenogramm gegen Staphylococcus aureus getestet. Dieser Urin wies eine schwache antibakterielle Aktivität auf, während normaler Kaninchenurin unwirksam war. Es gelang mir jedoch nicht, ein Hydrolyseprodukt des Aucubins im Urin der Tiere papierchromatographisch nachzuweisen. Ob nun diese schwache antibakterielle Aktivität durch das mit der Nahrung aufgenommene aktive Prinzip der Plantagoblätter oder durch sekundäre Faktoren hervorgerufen wird, kann daher nicht entschieden werden. Leider standen mir für diese Versuche nur vier Kaninchen zur Verfügung; die Ergebnisse dürfen daher nicht zu hoch bewertet werden.

f) Teste mit Agnusid.

Agnusid, ein Pseudoindikan, das E.WINDE[69] erstmalig aus der Verbenaceae Vitex agnus castus L. isolieren konnte, ist ein Ester der p-Hydroxybenzoesäure mit dem Aucubin. Da zahlreiche Ester der p-Hydroxybenzoesäure antimikrobielle Eigenschaften aufweisen, sollte auch dieses Pseudoindikan und sein Hydrolyseprodukt bakteriologisch getestet werden.

Eine wässerige Lösung des Agnusids und eine Hydrolyselösung - sie wurde durch Einwirken von ß-Glukosidase auf die Lösung des Glukosides bereitet - wurden im Lochtestverfahren auf wachstumshemmende Eigenschaften gegen die gleichen Bakterienstämme geprüft. Weder das Glykosid noch das Hydrolysat übten einen bakteriostatischen Einfluß aus. Das Verseifungsprodukt+) des Agnusids weist dagegen nach Einwirken von ß-Glukosidase die gleichen antibakteriellen Eigenschaften wie das Aucubinhydrolysat auf.

+) Durch alkalische Verseifung von Agnusid erhielt M.SIRAIT ein Spaltprodukt, das er später als Aucubin identifizierte. Eine Probe dieser Substanz stellte er mir zur Verfügung; ich danke ihm an dieser Stelle dafür.

g) Teste mit Asperulosid.

Als drittes Pseudoindikan wurde das Asperulosid und das Hydrolyseprodukt auf eine eventuelle antibakterielle Aktivität geprüft. Nach neuen Untersuchungen (J.GRIMSHAW[23], J.M.BOBBITT) sind die Pseudoindikane als einheitliche Stoffklasse anzusehen, es bestand daher die Möglichkeit einer antimikrobiellen Wirksamkeit des Asperulosidhydrolysates. Ein asperulosidhaltiger wässeriger Extrakt aus Galium aparine L. wurde mit einigen Kristallen ß-Glukosidase versetzt und nach 24 Stunden (Aufbewahrung im Eisschrank bei 6°C) gegen einige Mikroorganismen getestet. Für den Blindversuch wurde der wässerige Extrakt ohne Zusatz von ß-Glukosidase verwendet. Weder die wässerige Lösung des Asperulosids noch die Hydrolyselösung riefen eine Wachstumshemmung der Bakterien hervor.

Als Testbakterien wurden folgende Stämme verwendet: Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis und Mycobacterium phlei.

h) Teste mit dem Pseudoindikan aus Veronica virginica L.

Die Scrophulariaceae Veronica virginica enthält neben Aucubin ein weiteres Pseudoindikan, dessen Struktur noch nicht bekannt ist. Diese Substanz wurde ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen. Bakteriologisch wurden der wässerige Gesamtextrakt, eine wässerige Lösung des Pseudoindikans und des Hydrolysates (hergestellt durch Einwirken von ß-Glukosidase auf die Lösung bei 6°C im Kühlschrank) getestet. Von diesen Lösungen wies nur der Gesamtextrakt eine geringe antibakterielle Aktivität auf (Tabelle VIII), das Pseudoindikan und das Hydrolysat waren unwirksam. Die schwache Hemmwirkung des Extraktes wird wahrscheinlich durch die phenolischen Inhaltsstoffe (Zimtsäurederivate, F.B.POWER und H.ROGERSON[52]) hervorgerufen.

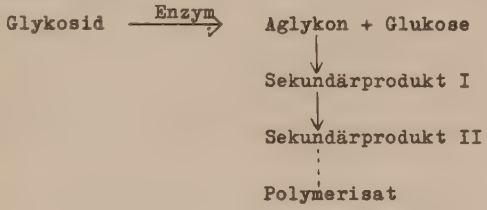
Tabelle VIII

(Wirkung des wässerigen Extraktes der Wurzeln von Veronica virginica auf einige Mikroorganismenspezies.)

Teststamm	Wirkung	Durchmesser
Staphylococcus aureus	++	17,4 mm
Streptococcus pyogenes	+	10,2 mm
Bacillus subtilis	++	15,3 mm
Mycobacterium phlei	++	15,5 mm

Diskussion

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das Aucubinhydrolysat die antibakterielle Wirkung der beiden Plantago-Arten hervorruft. In den Pflanzen liegt die Verbindung in einer unwirksamen Vorstufe glykosidisch gebunden vor, aus der sie durch enzymatische Spaltung gebildet wird. Ob nun das primär entstehende Aucubigenin oder ein Sekundärprodukt als das aktive Prinzip anzusehen ist, läßt sich an Hand der vorliegenden Ergebnisse nicht sicher entscheiden. Geht man von der Vermutung aus, daß die Polymerisation des Aglykons über mehrere Zwischenstufen vor sich geht, so können alle entstehenden Zwischenprodukte der aktive Wirkstoff sein (Schema).



Die papierchromatographischen Untersuchungen der Hydrolyselösung ergaben jedoch keine Anhaltspunkte, die auf Sekundärprodukte schließen lassen. Auf dem Chromatogramm waren nur die drei Flecke des Aucubins, des Aucubigenins und des Polymerisates sichtbar. Das Aucubigenin könnte daher die antibakterielle Wirkung hervorrufen, denn sowohl das Glukosid als auch das Polymerisat sind unwirksam. Jedoch erbringen die papierchromatographischen Prüfungen nicht den absoluten Beweis, daß keine Intermediärprodukte auftreten. Es könnte eine sehr instabile Verbindung entstehen, die die antibakterielle Aktivität bewirkt, papierchromatographisch aber nicht nachweisbar ist. Derartige Substanzen sind schon bei anderen Pflanzen bekannt: Die aktiven Prinzipien des Meerrettichs und der Kapuzinerkresse entstehen durch Hydrolyse der Senfölglykoside. Als Endprodukte treten die wirksamen Senföle auf; die Aktivität des Hydrolysates ist jedoch bedeutend größer als die des entsprechenden Senföles. Es bilden sich also wirk-

samere Zwischenprodukte, die man bisher noch nicht chemisch nachweisen konnte (A.G.WINTER[68], E.SCHINDLER und H.ZIPF[59]).

Auch in dem frischen Preßsaft der Blätter konnte Aucubigenin (nach R.PARIS u.M.CHASLOT[50]) papierchromatographisch nachgewiesen werden. Es ließ sich jedoch nicht feststellen, ob das Aglykon in der Pflanze genuin vorkommt, oder ob es erst bei der Aufbereitung durch Einwirken der Fermente auf das Glukosid entsteht. Dagegen war es nicht möglich, das Aucubigenin im Kaltmazerat der trockenen Blätter nachzuweisen, da die braungefärbten Gerbstoffe die dunkle Farbe des Aucubigeninfleckes auf dem Chromatogramm überdeckten.

Da auch das Mazerat der trockenen Blätter antibakteriell wirkt, kann man das aktive Prinzip nicht als "flüchtiges Phytoncid" bezeichnen, wie es R.L.ROSENFELD und L.J.CHAZANOWITSCH[58] vorschlugen. Wird jedoch der Extrakt auf 100°C erhitzt, so weist er keine antimikrobiellen Fähigkeiten mehr auf; der Wirkstoff ist entgegen der Auffassung von E.FREERKSEN und R.BÖNICKE[18] nicht thermostabil. Dieses Ergebnis ist leicht erklärlich, da das Hydrolyseprodukt beim Erhitzen sofort polymerisiert wird und die glukosidspaltenden Fermente zerstört werden. Erst nach Zugabe von ß-Glukosidase zu der erkalteten Lösung findet wieder die Hydrolyse des Glukosides zum Wirkstoff statt; der Extrakt wirkt wieder antibakteriell.

Auch die Feststellung von E.FREERKSEN und R.BÖNICKE - das aktive Prinzip erscheint nach Verfütterung von Plantagoblättern quantitativ im Urin von Kaninchen - konnte durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Der Urin wies nur eine geringe antibakterielle Wirkung auf. Ob nun diese schwache Aktivität durch das mit der Nahrung aufgenommene antibakterielle Prinzip der Plantagoblätter oder durch sekundäre Faktoren hervorgerufen wird, kann noch nicht entschieden werden. Papierchromatographisch ließen sich jedoch keine Hydrolyseprodukte des Aucubins im Urin nachweisen.

Zusammenfassung

1) Eine 2 %ige wässerige Lösung von Aucubin und ß-Glukosidase wurde im Lochtestverfahren gegen 20 verschiedene Bakterienstämme, darunter grampositive und gramnegative, pathogene und apathogene Keime, getestet. Das Wachstum sämtlicher Mikroorganismen wurde gehemmt. Die Ergebnisse wurden jeweils aus 30 Versuchen ermittelt; die Fehlerbreite betrug $\pm$ 13 %. Gegenüber Staphylococcus aureus weisen 0,1 ml einer 0,2 %igen Lösung unter gleichen äußeren Bedingungen den gleichen Hemmungshof wie 0,6 i.E. Penicillin auf.
2) Aucubin selbst ist unwirksam. Bei dem eigentlichen bakteriostatischen Prinzip handelt es sich um ein labiles Spaltprodukt der ß-Glukosidasewirkung; offen aber ist, ob es sich bei dem Wirkstoff um das hypothetische Aglykon Aucubigenin handelt. In der Hydrolyselösung wurden papierchromatographisch Aucubin und zwei seiner Hydrolyseprodukte ("Aucubigenin" nach R.PARIS und M.CHASLOT[50]) sowie ein braunes Polymerisat) nachgewiesen.
3) Die Preßsäfte der frischen Blätter von Plantago lanceolata und Plantago media sowie das Mazerat des trockenen Krautes von Plantago lanceolata besitzen ebenfalls antibakterielle Eigenschaften; die Wirksamkeit der Preßsäfte entspricht etwa ihrem Gehalt an Aucubin. Dagegen wirkt die wässerige Abkochung (Inaktivierung der pflanzeneigenen Fermente) erst nach Zusatz von ß-Glukosidase. Auch aucubinfreier Plantagosaft ist unwirksam.
4) In den Plantagoauszügen wurden folgende Inhaltsstoffe nachgewiesen: Aucubin und seine beiden Hydrolyseprodukte, Chlorogensäure, Ursolsäure und ein Flavonoid.
5) In reiner kristalliner Form wurde Aucubin in einer Ausbeute von 0,1 % aus den frischen Blättern von Plantago media isoliert.
6) Aus der getrockneten Droge von Plantago lanceolata wurde Ursolsäure in 0,1 %iger Ausbeute isoliert.

7) Chlorogensäure, Ursolsäure und das Flavonoid sind an der bakteriostatischen Gesamtwirkung der beiden Blattdrogen nicht beteiligt.

8) Werden Versuchstiere (Kaninchen) 4 Tage lang ausschließlich mit Plantagoblättern ernährt, so weist der Harn eine geringe antibakterielle Aktivität auf. Aucubin oder ein aktives Hydrolyseprodukt des Aucubins konnten im Harn, wie erwartet, nicht nachgewiesen werden. Damit konnten die Angaben von FREERKSEN und BÖNICKE[18] - das antibakterielle Prinzip der Plantagoblätter erscheint quantitativ und unverändert im Harn - nicht reproduziert werden.

9) Andere dem Aucubin verwandte Pseudoindikane: Agnusid, Asperulosid und ein unbekanntes Pseudoindikan der Veronica virginica erwiesen sich - auch zusammen mit ß-Glukosidase - als unwirksam.

V E R S U C H S T E I L

I. Phytochemische Untersuchungen

a) Papierchromatographische Untersuchungen.

Die frisch gesammelten Blätter von Plantago lanceolata und P.media wurden eine halbe Stunde lang mit Methanol extrahiert. Je 0,1 ml der Auszüge wurden auf den Startpunkten des Papiers (SCHLEICHER und SCHÜLL 2043 bM) angereichert: das Chromatogramm wurde im aufsteigenden Verfahren mit Butanol-Methanol-Wasser (4:1:5, v/v/v, obere Phase) entwickelt. Nach dem Trocknen wurden die Chromatogramme ausgewertet.

Da im Tageslicht keine Flecken zu erkennen waren, wurden die Chromatogramme im UV.-Licht betrachtet und die sichtbaren Flecke markiert. Danach wurden sie mit verschiedenen Reagenzien besprüht, um weitere Verbindungen erkennbar zu machen und zu charakterisieren. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

I : eine 2 %ige Lösung von $FeCL_3$ in Methanol

II : eine 1 %ige Lösung von KOH in Methanol

III : eine 2 %ige methanolische $AlCl_3$-Lösung

IV : eine methanolische Lösung diazotierter Sulfanilsäure, das noch feuchte Chromatogramm wurde mit NH_3-Dämpfen behandelt.

V : eine gesättigte Lösung von $SbCl_3$ in Chloroform, danach Erhitzen auf 100°C.

VI : eine 5 %ige Lösung von CCl_3COOH in Methanol, nach dem Trocknen wurde das Chromatogramm auf 100°C erhitzt.

Außerdem wurde das Chromatogramm nach dem Behandeln mit Ammoniakdämpfen sowie nach dem Besprühen mit Reagenz III unter dem UV.-Licht betrachtet.

Identifizierung der Chlorogensäure R_f= 0,40. Die Chlorogensäure wurde durch Vergleichschromatogramme mit authentischer Chlorogensäure in verschiedenen Laufmitteln identifiziert.

Es wurden folgende Systeme verwendet:
Butanol-Methanol-Wasser 4:1:5, v/v/v R_f= 0,40
Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5, v/v/v R_f= 0,64
Essigsäure-Wasser 15:85, v/v R_f= 0,72
Isopropanol-Wasser 30:70, v/v R_f= 0,78
Zur weiteren Identifizierung wurde die Absorption des alkoholischen Fleckeneluats gemessen. Der Chlorogensäurefleck wurde aufgrund seiner blauen Fluoreszens unter dem UV.-Licht ausgeschnitten und mit 75 %igen Äthanol eluiert, die Absorption des Eluates wurde in einem Spektral-Photometer PMQ II der Firma C.ZEISS gemessen. Das Maximum der Kurve lag bei 329 mμ, die Extinktion betrug 0,08.

Der Gehalt der Säure in der Droge wurde ebenfalls durch Vergleichschromatogramme ermittelt. Auf den Startpunkten der Chromatogramme wurden 0,1 ml eines methanolischen Blattextraktes (1:10(sowie verschiedene Konzentrationen einer reinen Chlorogensäurelösung aufgetragen. Die Größe der Flecke wurde unter dem UV.-Licht verglichen. Es ergab sich ein Gehalt von etwa 0,3 - 0,4 %.

b) Isolierung von Aucubin aus den Blättern von Plantago media.

Zwei Kilogramm der frisch gesammelten Blätter wurden eine halbe Stunde lang in vier Liter Wasser unter Zusatz von 10 g Calciumkarbonat im Dampfdrucktopf bei 100 bis 105°C ausgekocht und danach sofort heiß abfiltriert und unter starkem Druck ausgepreßt. Der so erhaltene wässerige Extrakt wurde zur Entfernung des überschüssigen Wassers unter erneutem Zusatz von etwas Calciumkarbonat bei vermindertem Druck auf etwa 1000 ml eingeengt. Dabei war zu beachten, daß die Temperatur nicht über 40°C stieg, da sonst ein Teil des Aucubins zerstört werden konnte. Die wässerige Flüssigkeit wurde nun so lange mit Petroläther ausgeschüttelt, bis dieser farblos blieb.

Dabei konnte bereits ein Teil der Begleitstoffe aus der Lösung entfernt werden. Zur völligen Entfernung dieser Stoffe wurde daraufhin so viel einer 20 %igen Bleiazetatlösung zugefügt, bis eine weitere Zugabe keine Fällung mehr hervorrief. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und so lange mit warmem Wasser gewaschen, bis eine Probe beim Erhitzen mit Reagenz A keine Blaufärbung mehr ergab. In die vereinten wässerigen Lösungen wurde zur Entfernung des überschüssigen Bleiazetat Schwefelwasserstoff eingeleitet, das entstehende Bleisulfid sofort mittels einer Filternutsche abgesaugt und das Filtrat zur Neutralisierung der Essigsäure mit Calciumkarbonat versetzt. Dabei mußte beachtet werden, daß das Bleisulfid wesentliche Mengen des Aucubins adsorbieren kann; aus diesem Grunde war ein mehrmaliges Waschen mit warmem Wasser notwendig. Der gesamte wässerige Auszug wurde nun unter vermindertem Druck bei Anwesenheit von etwas Calciumkarbonat bis zur Trockne eingeengt. Infolge der großen Menge an Begleitstoffen ließ sich hieraus noch kein kristallines Aucubin erhalten. Daher wandte ich die Methode der Azetylierung des Trokkenextraktes nach P.KARRER und H.SCHMID[35] an, indem ich den Rückstand im Vakuumexsikkator völlig trocknete, mit wenig Pyridin und Essigsäureanhydrid versetzte und 10 Stunden lang bei 30°C stehen ließ. Dabei wurde das Aucubin in das Hexaazetat überführt, ein Teil der Begleitstoffe wurde aber ebenfalls azetyliert. Hierzu wurde nun Eiswasser gegeben, um das überschüssige Anhydrid zu verseifen. Die Azetylierungsprodukte wurden in Essigester/Äther (1:1) gelöst und nacheinander mit gesättigter Natriumbikarbonatlösung, 1 %iger wässeriger Salzsäure, wieder mit der Bikarbonatlösung und schließlich mit Wasser gewaschen. Die Essigester-Äther-Phase wurde zur Entfernung des restlichen Wassers über Natriumsulfat getrocknet, danach stark eingeengt und mit Petroläther überschichtet. Dabei kristallisierte die Hauptmenge des azetylierten Nebenproduktes aus, während das Aucubinhexaazetat in der braunen Mutterlauge zurück blieb. Es gelang mir nicht, hieraus reines

Aucubinazetat zu erhalten. Deshalb wurde der braungefärbte, etwas ölige Rückstand mit Bariumhydroxydlösung verseift, zur Trockne eingedampft und das Aucubin in wenig Essigester, der 15 % Methanol enthielt, gelöst. Nach dem Einengen der Flüssigkeit und Überschichten mit Äther kristallisierte nach einiger Zeit noch unreines Aucubin aus, das durch mehrfaches Umkristallisieren aus heißem Äthanol rein erhalten werden konnte. Die Ausbeute aus 2 kg Droge betrug 2,1 g, das entsprach 0,1 %. Wie aus der Gehaltsbestimmung (s.S. 65) hervorging, enthielten die Blätter etwa 0,6 % Aucubin; es konnten also mit dieser Methode nur 17 % des Glukosides gewonnen werden.

Die Reinheit des Aucubins wurde durch den Schmelzpunkt, die Drehung und durch papierchromatographische Untersuchungen sicher gestellt.

Schmp. = 181,5°C (Koflerblock)

$[\alpha]_D^{20}$ = -163,0°C (c = 1,6005 Wasser)

c) Isolierung von Aucubin aus den Samen von Plantago lanceolata.

Die Hauptmenge des benötigten Aucubins gewann ich aus den Samen von Plantago lanceolata in Anlehnung an die Isolierungsmethode von P.KARRER und H.SCHMID[35]. Zwei Kilogramm der Samen wurden feinst zermahlen und zweimal mit je 5 Liter Methanol drei Stunden lang am Rückflußkühler ausgekocht. Der Auszug wurde abfiltriert und der Rückstand bei ca 100 AT ausgepreßt. Die Gesamtmenge wurde nun unter vermindertem Druck bei Anwesenheit von Calciumkarbonat zu einem dickflüssigen Brei eingeengt, der mit 2 Liter Wasser von 40 bis 45°C aufgenommen wurde. Anschließend wurde die wässerige Lösung so lange mit Petroläther fraktioniert ausgeschüttelt, bis dieser nicht mehr gefärbt wurde. Da ein geringer Teil des Aucubins auch in die lipophile Phase

aufgenommen wurde, mußte diese mit Wasser ausgewaschen werden. Die vereinigten wässerigen Auszüge wurden mit 20 %iger Bleiazetatlösung versetzt, um weitere Begleitstoffe zu entfernen. Nachdem bei erneuter Zugabe von Bleiazetatlösung kein Niederschlag mehr entstand, wurde dieser abfiltriert und so lange mit warmem Wasser gewaschen, bis eine Probe des Filtrates beim Erhitzen mit Reagenz A keine Blaufärbung mehr zeigte. Das überschüssige Blei mußte sodann mit Hilfe von Schwefelwasserstoff aus der wässerigen Lösung entfernt werden, das entstehende Bleisulfid wurde sofort abfiltriert und ebenfalls öfters mit warmem Wasser ausgewaschen, bis im Waschwasser kein Aucubin mehr nachzuweisen war. Das Filtrat wurde zur Neutralisierung mit einer ausreichenden Menge Calciumkarbonat versetzt und wiederum unter stark vermindertem Druck bis fast zur Trockene eingedampft. Der so erhaltene Rückstand wurde mit möglichst wenig Methanol aufgenommen, mit viel gereinigtem Seesand verrieben und danach im Vakuumexsikkator völlig getrocknet. Daraus konnte nun das Aucubin mit reinem Aceton, dem 5 % Äthanol und 1 % Wasser zugesetzt wurden, im Soxhlet-Apparat extrahiert werden. Die Flüssigkeit wurde eingeengt und zum Kristallisieren in den Eisschrank (ca 6°C) gestellt. Dabei fiel nach einigen Stunden schon recht reines Aucubin aus, das in den charakteristischen Rosetten kristallisierte.

Der Seesand wurde zur Gewinnung weiteren Aucubins nochmal einige Stunden lang mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch ausgezogen. Das hierbei gewonnene Aucubin war zwar noch stark verunreinigt, konnte aber durch mehrfaches Umkristallisieren aus heißem 96 %igen Äthanol, dem etwas Aktivkohle beigefügt wurde, rein erhalten werden. Daraufhin wurde das Aucubin wieder in möglichst wenig warmem Äthanol gelöst, die Lösung wurde mit Petroläther überschichtet und in den Kühlschrank gestellt. Allmählich fiel dann das reine Aucubin kristallin aus; es wurde abfiltriert und im Exsikkator getrocknet.

Schmp. = 181 - 182°C

Aus 2 Kilogramm Samen erhielt ich eine Ausbeute von 10,5 Gramm Aucubin, das waren 0,52 %. P.KARRER und H.SCHMID[35] gelangten zu einer Gesamtausbeute von 1,4 %; der Gehalt an Aucubin kann in den verschiedenen Samen, wie die Autoren feststellten, sehr unterschiedlich sein. Bei der Gehaltsbestimmung der von mir verwendeten Samen wurde ein Gehalt von 0,95 % Aucubin ermittelt, es gelang mir nur, 55 % des Glukosides rein zu erhalten.

d) Photometrische Bestimmung von Aucubin.

1. Aufstellung einer Standardeichkurve.

Eine genau abgewogene Menge des Aucubins wurde in einem Meßkolben von 50 ml Inhalt in je 2 ml Wasser und Methanol pro analysi gelöst. Dazu wurden 2 ml einer Mischung von Eisessig-25 %iger Salzsäure (98 + 2) gegeben; die Lösung wurde sofort in ein siedendes Wasserbad gebracht und genau 5 Minuten lang erhitzt. Danach wurde der Kolben in Wasser von 20°C gestellt und mit Methanol p.a. bis zur Marke aufgefüllt, die Intensität der Blaufärbung wurde gemessen. Bei der Temperatur von 20°C läßt sich die blaue Farbe über drei bis vier Stunden lang stabil erhalten, die Intensität der Farbe bleibt konstant.

Als Vergleichslösung wurde eine Mischung von 2 ml Wasser, 2 ml der Eisessig-Salzsäure-Lösung und 46 ml Methanol p.a. hergestellt.

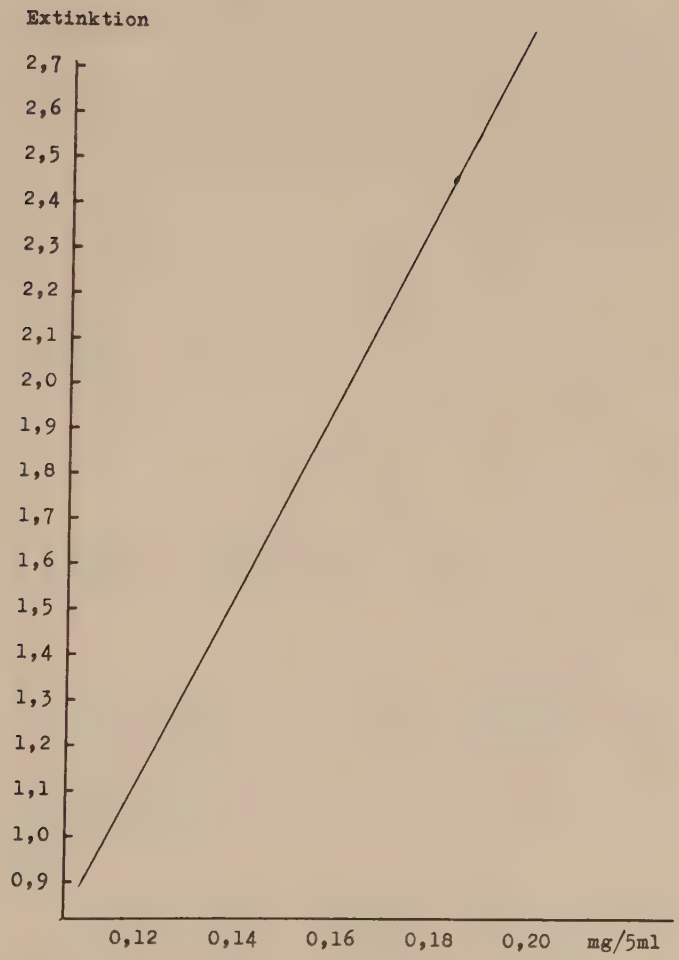
Die Intensität der Blaufärbung ist in den Grenzen 0,11 bis 0,20 mg Aucubin pro fünf ml Lösungsmittel genau der Menge Aucubin proportional (Abbild I, Tabelle IX). Gemessen wurde bei einer Wellenlänge λ = 615 mμ.

Das Maximum des UV.-Absorptionsspektrum liegt bei einer Wellenlänge von 615 mμ, das Minimum bei λ = 508 mμ (Abbild II).

Die Messungen wurden mit dem Spektralphotometer PMQ II der Firma Carl ZEISS in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke durchgeführt.

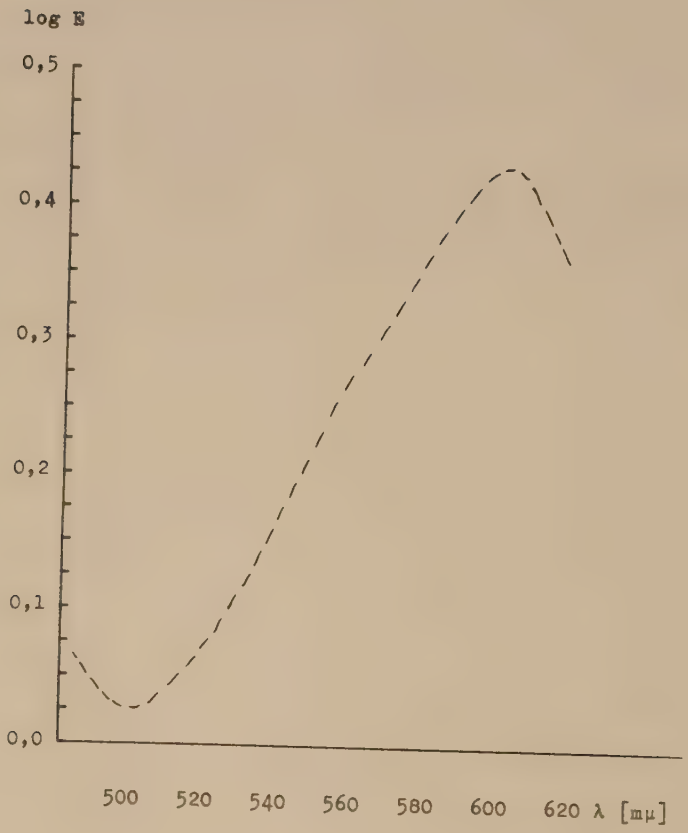
Anschließend wurde die Temperatur, bei der die Blaufärbung die größte Farbtiefe erreicht, bestimmt. Hierzu wurde die Aucubin-Säure-Lösung auf folgende Temperaturen erhitzt: 75°C, 80°C, 85°C, 90°C und 100°C; die Extinktion der Lösungen wurde bei λ = 615 mμ gemessen. Durch Erhitzen auf 100°C wurde die größte Extinktion erreicht.

Die Ergebnisse dieser Messungen wurden in der nachfolgenden Tabelle X dargelegt. Die Konzentration der Lösung betrug 1,4 mg Aucubin auf 50 ml Lösungsmittel.



Abbild I

Standard-Eichkurve von Aucubin-Blau bei λ = 615 mμ



Abbild II

UV.-Absorptionsspektrum von Aucubin-Blau in Methanol

Tabelle IX

Extinktion bei λ = 615 mμ	mg Aucubin in 50 ml
0,084	1,1 mg
0,096	1,2 mg
0,143	1,4 mg
0,155	1,5 mg
0,218	1,8 mg
0,238	1,9 mg
0,265	2,0 mg

Tabelle X

(Einfluß der Temperatur auf die Farbintensität bei der Säurereaktion+))

Temperatur	Extinktion bei λ = 615 mμ
75°C	0,029
80°C	0,041
85°C	0,070
90°C	0,100
100°C	0,143

+) Einwaage: 1,4 mg Aucubin auf 50 ml Lösungsmittel
Dauer des Erhitzens: 5 Minuten

2. Bestimmung des Gehaltes an Aucubin in den Samen von Plantago lanceolata L.

5 g fein gemahlene Samen wurden in 100 ml Wasser bei Anwesenheit von 3 g Calciumkarbonat eine halbe Stunde lang ausgekocht. Nach dem Erkalten wurde das verdampfte Wasser ersetzt und die Aufkochung durch eine 3 cm hohe Säule von neutralem Aluminiumoxyd WOELM filtriert, um die Pigmente zu entfernen. Das Filtrat war eine schwach gelb gefärbte Lösung, deren Eigenfarbe keinen Einfluß auf die photometrische Bestimmung hatte. 2 ml dieser Lösung wurden mit je 2 ml Methanol p.a. und der Eisessig-Salzsäure-Lösung versetzt und 5 Minuten lang in ein siedendes Wasserbad gebracht. Anschließend wurde sofort abgekühlt und mit Methanol auf 50 ml aufgefüllt.

Die Messung der blauen Lösung ergab eine Extinktion von 0,082 (bei einer Wellenlänge λ = 615 mμ), entsprechend einem Gehalt von 0,95 % Aucubin.

3. Bestimmung des Gehaltes an Aucubin in der Droge Herba Plantaginis lanceolatae.

5 g der trockenen Droge wurden in 100 ml Wasser unter Zusatz von 3 g Calciumkarbonat eine halbe Stunde lang ausgekocht, das verdampfte Wasser wurde ersetzt. Nach dem Auspressen wurde die Aufkochung durch eine 3 cm hohe Säule von neutralem Aluminiumoxyd WOELM filtriert; 2 ml des Filtrates wurden mit 2 ml Methanol p.a. und 2 ml des Säuregemisches 5 Minuten lang auf dem Wasserbad von 100°C erhitzt. Danach wurde mit Methanol auf 50 ml aufgefüllt und gemessen.

Die Extinktion bei λ = 615 mμbetrug 0,224, entsprechend einem Gehalt von 1,8 % Aucubin.

In den frischen Blättern wurde ein durchschnittlicher Gehalt von 0,6 % Aucubin ermittelt.

4. Schnellbestimmung mit einer Vergleichslösung.

Neben der photometrischen Bestimmung wurde eine Methode ausgearbeitet, die es ermöglicht, einen annähernden Gehalt an Aucubin schnell zu ermitteln.

2 ml der durch die Aluminiumsäule filtrierten Plantago-Aufkochung wurden in einem Reagenzglas von 20 ml Inhalt mit je 2 ml Methanol und der Säuremischung versetzt und ebenfalls genau 5 Minuten lang gekocht und anschließend sofort abgekühlt.

Eine Vergleichslösung wurde aus folgenden Reagenzien in einem 2. Reagenzglas zubereitet:

0,5 %ige $CuSO_4$-Lösung	3 ml
0,5 %ige $K_2Cr_2O_7$-Lösung	1 ml
10,0 %ige NH_3-Lösung	2 ml

Beide Lösungen zeigten in der Aufsicht etwa die gleiche Farbintensität und den gleichen Farbton.

Mit Hilfe der Vergleichslösung läßt sich schnell feststellen, ob noch ein Gehalt von 1,8 bis 2 % Aucubin in der Droge vorhanden ist, oder ob ein wesentlicher Verlust eingetreten ist.

e) Papierchromatographische Untersuchung des Aucubinhydrolysates.

Eine 2 %ige wässerige Aucubinlösung wurde mit einigen Kristallen ß-Glukosidase versetzt und eine Woche lang im Kühlschrank (6°C) aufbewahrt. 0,1 ml dieser Lösung wurden auf den Startpunkten des Papiers (SCHLEICHER und SCHÜLL 2043 bM) angereichert. Entwickelt wurde das Chromatogramm mit dem Laufmittel Butanol-Methanol-Wasser (4:1:5, v/v/v, obere Phase) im aufsteigenden Verfahren (Laufzeit: 5 Stunden). Nach dem Trocknen wurde das Chromatogramm mit einer 5 %igen methanolischen Trichloressigsäurelösung besprüht und 5 Minuten lang im Trockenschrank auf 105°C erhitzt. Dadurch wurden auf dem Chromatogramm 3 dunkle

Flecke sichtbar: das Glukosid, das Aglykon und das Polymerisat. (Abbildung III)

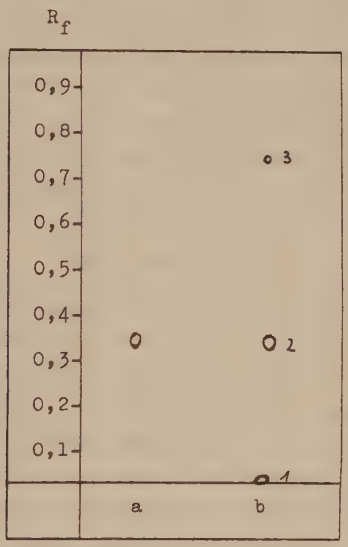


Abbildung III

Es bedeuten: a = Aucubinlösung
b = Aucubinhydrolysat
1 = Polymerisat
2 = Aucubin
3 = Aucubigenin (nach M.PARIS u.R.CHASLOT[50])

f) Isolierung und Charakterisierung der Ursolsäure.

100 g des getrockneten Krautes von Plantago lanceolata wurden in einem Soxhlet-Apparat zuerst mit Petroläther und anschließend mit Äther extrahiert. Der Ätherauszug wurde eingeengt und der Rückstand zur Entfernung des Chlorophylls mit Chloroform gewaschen. Der graue kristalline Rückstand ergab eine positive LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion.

Nach mehrfachem Umkristallisieren aus heißem 96 %igen Äthanol und Trocknen im Exsikkator zeigte die Substanz einen konstanten Schmelzpunkt:

Schmp. = 275 - 278°C (Kofler-Block)

Im Mischschmelzpunkt mit authentischer Ursolsäure, die aus den Blättern von Arctostaphylos uva ursi isoliert wurde, trat keine Depression auf.

Die dünnschichtchromatographische Prüfung nach E.STAHL[62] der isolierten Kristalle und der reinen Ursolsäure lieferte die gleichen R_f-Werte und die gleiche Farbe beim Besprühen mit Antimontrichlorid in Chloroform. Im Laufmittel Methanol-Aceton-Chloroform (5/20/75, v/v/v, Kieselgel G MERCK) ergab sich ein

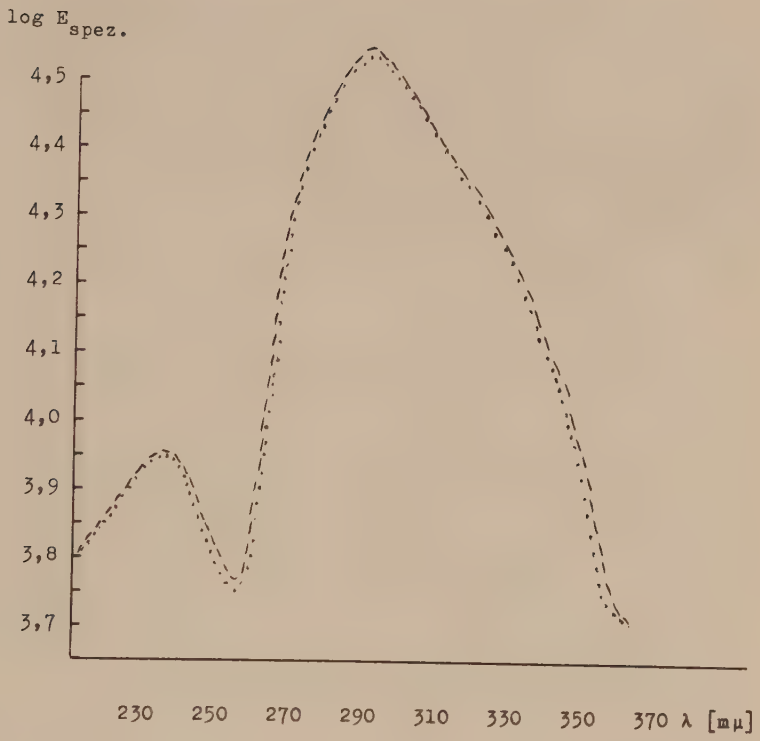
$$R_f = 0{,}90$$

Die UV.-Absorptionsspektren der authentischen Ursolsäure und der isolierten Kristalle waren identisch. Die Extinktionswerte wurden in konzentrierter Schwefelsäure eine halbe Stunde nach dem Lösen mit einem Spektralphotometer PMQ II der Firma C.ZEISS in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke gemessen. Die Konzentrationen der Lösungen betrugen:

$0{,}394.10^{-4}$ Mol/Liter (authentische Ursolsäure)

$0{,}332.10^{-4}$ Mol/Liter (Ursolsäure aus Plantago)

Die Spektren der beiden Substanzen stimmten überein (Abbild IV).



Abbild IV

UV.Absorptionsspektrum der Ursolsäure

------ = authentische Ursolsäure

..... = Ursolsäure aus Plantago

g) Isolierung von Agnusid.

Das für die bakteriologischen Untersuchungen notwendige Agnusid isolierte ich nach der Methode von E.WINDE[69] aus den Blättern von Vitex agnus castus L. auf die gleiche Weise, wie das Aucubin aus den Plantagosamen. Die Reinheit des Glykosides ergab sich aus dem Schmelzpunkt und papierchromatographischen Prüfungen (System: Butanol-Eisessig-Wasser, 4:1:5, v/v/v. Papier: SCHLEICHER und SCHÜLL 2043 bM).

Schmp. = 145 - 146°C (Kofler-Block)

R_f = 0,75

h) Papierchromatographische Untersuchungen der Wurzelextrakte von Veronica virginica L.

100 g der fein gemahlenen Wurzeln wurden in einem Soxhlet-Apparat mit 250 ml Methanol extrahiert, das Lösungsmittel wurde auf 100 ml eingeengt. Je 0,1 ml dieser Lösung wurden auf den Startpunkten des Papiers angereichert. Entwickelt wurden die Chromatogramme mit verschiedenen Laufmitteln. Als Vergleichssubstanzen wurden Aucubin, Aucubigenin (nach R.PARIS und M.CHASLOT[50]) und Agnusid chromatographiert.

Es wurden folgende Lösungsmittelsysteme verwendet:

1. Butanol-Methanol-Wasser (4:1:5,v/v/v)
2. Butanol-Ammoniak (25%) (4:1,v/v)
3. Essigester-Pyridin-Wasser (7:2:1,v/v/v)
4. m-Kresol-Eisessig-Wasser (50:2:48,v/v/v)

Die R_f-Werte sind in der Tabelle XI zusammengestellt worden.

Tabelle XI

(R_f-Werte einiger Pseudoindikane in verschiedenen Laufmitteln)

Pseudoindikan	R_f-Wert im Laufmittel			
	1	2	3	4
Aucubin	0,35	0,26	0,20	0,28
Aucubigenin	0,75	0,05	0,05	---
Agnusid	0,76	0,22	0,95	0,55
Leptandra-Substanz	0,75	0,62	0,86	0,65

II. Bakteriologische Untersuchungen

a) Allgemeine Arbeitsmethode

Für sämtliche bakteriologischen Untersuchungen wurden folgende gleichbleibende Bedingungen angewendet. Als Nährsubstrat für die verschiedenen Teststämme diente Bouillon-Agar; jeweils 14 ccm des verflüssigten Agars wurden in Petrischalen von 9 cm Durchmesser gegossen. Nach dem Erstarren wurde in der Mitte der Agarplatten ein Loch von 10 mm Durchmesser mit Hilfe eines sterilen Korkbohrers ausgestanzt, das Loch wurde mit 2 bis 3 Tropfen geschmolzenen Agars abgedichtet. Danach wurden die Platten mit einer 24-stündigen flüssigen verdünnten Kultur des jeweiligen Testbakteriens beimpft. Die Verdünnung wurde mit steriler physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 10^6 durchgeführt. In das Loch wurde 0,1 ml der zu untersuchenden Lösung hineinpipettiert. Die Ergebnisse wurden nach einer Bebrütungszeit von 20 Stunden (Bebrütungstemperatur 37°C) abgelesen. Eine Ausnahme bildete hier Mycobacterium phlei, das sehr langsam auf diesem Nährboden wächst. Deshalb konnte das Ergebnis erst nach 72 Stunden abgelesen werden. Gemessen wurde der Durchmesser des um das ausgestanzte Loch entstandenen klaren ungetrübten Hofes.

Als Teststämme dienten 20 verschiedene Bakterien, darunter pathogene und apathogene, grampositive und gramnegative Bakterien, sowie das zu den säurefesten Stäbchen gehörende Mycobakterium phlei.

b) Teste mit einer wässerigen Lösung des Aucubinhydrolysates.

Eine 2 %ige Aucubinlösung in sterilem Wasser wurde mit einigen Kristallen ß-Glukosidase (Fa.C.ROTH, Karlsruhe) versetzt und 24 Stunden lang im Kühlschrank (6°C) aufbewahrt. Je 0,1 ml dieser Lösung wurden in die ausgestanzten Löcher der beimpften Platten pipettiert; die Platten blieben danach eine Stunde lang

bei normaler Zimmer temperatur (20°C) stehen, um ein Diffundieren des Wirkstoffes zu gewährleisten.

Die Ergebnisse wurden nach 20 Stunden abgelesen. In den Tabellen (siehe Hauptteil) wurden die mittleren Werte von jeweils 30 verschiedenen Platten, die mit dem gleichen Teststamm in gleicher Verdünnung beimpft wurden, angegeben. Die Fehlerbreite betrug $\pm$ 13 %.

c) Teste mit den Frischpflanzenpreßsäften aus Plantago lanceolata und Plantago media.

Die frisch gesammelten Blätter der beiden Plantago-Arten wurden getrennt voneinander in einer Saftzentrifuge ausgepreßt; der Preßsaft wurde zur Entfernung des Hauptteils des Chlorophylls durch ein Papierfilter filtriert. Je 0,1 ml der so erhaltenen Flüssigkeiten wurden in die ausgestanzten Löcher der beimpften Platten pipettiert.

d) Teste mit der Handelsware "Herba Plantaginis lanceolatae Erg.-Buch 6.

Um einen Vergleich zur Wirkung der Frischdroge zu erhalten, wurde zuerst der Feuchtigkeitsverlust, den die Plantagoblätter beim Trocknen erleiden, bestimmt. Die Blätter wurden bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank bei 40°C getrocknet. Im Durchschnitt betrug der Verlust 70 %. Um die Aktivitäten der Trockendroge und der Frischpflanze miteinander vergleichen zu können, wurden die Testlösungen auf folgende Weise zubereitet:

1. 30 g des trockenen Krautes wurden eine viertel Stunde lang in 70 g Wasser ausgekocht, das verdunstete Wasser wurde ersetzt und die noch heiße Abkochung ausgepreßt. Nach dem Erkalten wurden die bakteriologischen Teste ausgeführt.
2. 10 ml der kalten Abkochung wurden mit einigen Kristallen ß-Glukosidase versetzt, 24 Stunden lang im Kühlschrank (etwa 6°C) aufbewahrt und anschließend geprüft.
3. 30 g der trockenen Droge wurden mit 70 g Wasser versetzt und 24 Stunden lang im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurde die Flüssigkeit abgepreßt und die Aktivität bestimmt.

e) Untersuchung des Kaninchenurins.

Vier Kaninchen, je 2 weibliche und männliche, wurden einige Tage lang ausschließlich mit frischen Plantagoblättern gefüttert. Am Morgen des zweiten Versuchstages wurde von jedem Tier etwas Urin mit einem Katheter abgenommen, der wachstumshemmende Einfluß des Urins wurde im auxenographischen Test gegen Staphylococcus aureus gemessen. Die zweite Urinabnahme fand sechs Stunden später statt, die dritte am Morgen des darauffolgenden Tages und die letzte nach weiteren sechs Stunden. Die Aktivität des Urins wurde jedes Mal möglichst schnell nach der Entnahme bestimmt.

Da der Kaninchenurin schwach antibakteriell wirkte (Tabelle XII), wurde versucht, das aktive Prinzip der Plantagoblätter papierchromatographisch im Urin nachzuweisen.

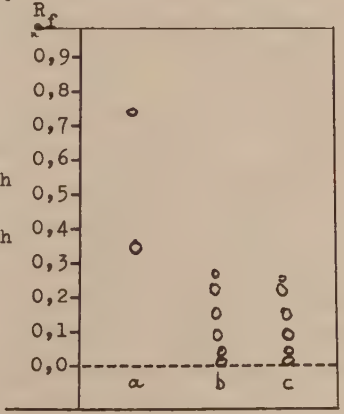
Je 0,1 ml des Urins wurden sofort nach dem Katheterisieren im Laufmittel Butanol-Methanol-Wasser (4:1:5), v/v/v) aufsteigend chromatographiert. Nach dem Trocknen wurden die Chromatogramme mit einer 5 %igen Trichloressigsäurelösung in Methanol besprüht und 5 Minuten lang und im Trockenschrank auf 100°C erhitzt. Als Vergleichslösungen wurden eine Aucubinhydrolyselösung und normaler Kaninchenurin ebenfalls chromatographiert. Im Urin ließen sich nach Verfütterung der Plantagoblätter weder Aucubin noch ein Hydrolyserodukt des Glukosides nachweisen (Abbild V).

Es bedeuten:

a = Aucubinhydrolysat

b = Kaninchenurin nach Plantagofutter

c = Kaninchenurin nach normalem Futter



Abbild V

Tabelle XII

(Wirkung des Urins von Kaninchen nach Plantagofütterung auf Staphylococcus aureus.)

Versuchstag	Futter	Urinentnahme	Wirkung	HofØ
Kaninchen Nr.1				
16.8.1960	Plantago	---	---	---
17.8.1960	"	9^h	+	11 mm
17.8.1960	"	15^h	+	11 mm
18.8.1960	normal	8^h	+	10 mm
18.8.1960	"	14^h	-	---
Kaninchen Nr.2				
16.8.1960	Plantago	---	---	---
17.8.1960	"	9^h	+	10 mm
17.8.1960	"	15^h	+	11 mm
18.8.1960	normal	8^h	+	10 mm
18.8.1960	"	14^h	-	---
Kaninchen Nr.3				
16.8.1960	Plantago	---	---	---
17.8.1960	"	9^h	+	12 mm
17.8.1960	"	15^h	+	11 mm
18.8.1960	normal	8^h	+	10 mm
18.8.1960	"	14^h	(+)	5 mm
Kaninchen Nr.4				
16.8.1960	Plantago	---	---	---
17.8.1960	"	9^h	+	9 mm
17.8.1960	"	15^h	+	10 mm
18.8.1960	normal	8^h	+	10 mm
18.8.1960	"	14^h	-	---

Während der Fütterungsversuche befanden sich die Kaninchen in Stoffwechselkäfigen; es konnte daher auch der Urin, der sich in der Zwischenzeit angesammelt hatte, bakteriologisch getestet werden. Es ließ sich jedoch bei diesem Urin nicht die geringste Aktivität beobachten.

f) Herstellung eines asperulosidhaltigen Extraktes aus Galium aparine L.

Die vegetativen Organe von Galium aparine enthalten das Pseudoindikan Asperulosid (H.HERISSEY[29]). Für die bakteriologischen Untersuchungen wurde auf folgende Weise eine Testlösung bereitet:

200 g des frisch gesammelten Krautes wurden eine halbe Stunde lang bei Anwesenheit von 3 g Calciumkarbonat in 400 ml Wasser ausgekocht, die Flüssigkeit wurde abfiltriert und der Rückstand ausgepreßt. Der Extrakt wurde unter vermindertem Druck zu einem dickflüssigen Brei eingeengt, der in 100 ml Methanol aufgenommen wurde. Diese methanolische Lösung wurde zur Entfernung des Hauptteils der Begleitstoffe durch eine Säule von neutralem Aluminiumoxyd WOELM gegeben; es wurde mit Methanol nachgewaschen und das Eluat unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde nun in 50 ml heißem Wasser gelöst. 1 ml der Lösung wurden mit 0,5 ml Reagenz A erhitzt, es entstand eine intensive Blaufärbung. Das Asperulosid war in der wässerigen Lösung enthalten, die anschließend bakteriologisch getestet wurde.

g) Herstellung der Testlösungen aus den Wurzeln von Veronica virginica L.

Lösung 1:200 g der fein gemahlenen Droge wurden in einem Perkulator mit einem Liter Methanol extrahiert; das Lösungsmittel wurde i.V. verjagt und der Rückstand mit 50 ml Wasser aufgenommen.

Lösung 2: Die fein gemahlenen Wurzeln wurden einige Tage lang mit Methanol perkuliert; der Extrakt wurde eingeengt, auf eine Säule von neutralem Aluminiumoxyd WOELM gegeben und an-

schließend wurde mit Methanol eluiert. Das gesuchte Pseudoindikan blieb am Aluminiumoxyd adsorbiert, während das Aucubin und andere Begleitstoffe ausgewaschen wurden. Mit Wasser ließ sich nun das Pseudoindikan eluieren. Es gelang mir jedoch doch nicht, diese Substanz rein zu erhalten. Für die bakteriologische Prüfung ließ sich aber das Eluat verwenden, da kein Aucubin enthalten war.

Lösung 3: Zu 10 ml der Lösung 2 wurden einige Kristalle ß-Glukosidase gegeben, die Lösung wurde 24 Stunden lang im Kühlschrank aufbewahrt.

Literaturverzeichnis

1) R.K.ALIEV: Am.J.Pharm. 122, 24, (1950)
2) F.AUSTER, J.SCHÄFER: Plantago major L. Leipzig 1958
3) F.BERGER: Handbuch der Drogenkunde Bd.IV, Wien 1954
4) M.BERGMANN, G.MICHALIS: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 60, 935, (1927)
5) F.BOAS: Acta Phytotherapeutica Juli 1959
6) L.BOURDIER: Journ. Pharm. Chim. 26, 254, (1907)
7) E.BOURQUELOT, H.HERISSEY: C.R.Acad.Sc. 134, 1441, (1902)
8) H.BRAUN: Pharm. Zentralhalle 89, 75, (1950)
9) M.BRIDEL, M.BRAECKE: Bull. Soc. Chim. Biol. 5, 10, (1923)
10) L.H.BRIGGS, B.F.CAIN: J. Chem. Soc. IV, 4182, (London 1954)
11) C.J.CAVALLITO, J.H.BAILEY: J. Amer. chem. Soc. 66, 1950 (1944)
12) M.CHASLOT: Sur l'aucuboside, chromogène glucosidique Dissertation Paris 1955
13) P.DUQUENOIS: Bull. Soc. Bot. France 102, 377, (1955)
14) P.DUQUENOIS: Bull. Soc. Bot. France 105, 526, (1958)
15) G.DUSINSKY, M.TYLLOVA: Ceskoslov. Farmac. 9, 60, (1960)
16) M.FELKOVA: Pharm. Zentralhalle 97/2, 61, u. 97/6, 263, (1958)
17) L.FERENCZY: Act. Biol. Acad. Scient. Hungarica 6, 317 (1955/56)
18) E.FREERKSEN, R.BÖNICKE: Z. Hyg. 132, 447, (1951)
19) S.FUJISE, H.OBARA, H.UDA: Chem. and. Ind. 78, 289, (1960)
20) K.GEMEINHARDT: Ber. Bot. Ges. 56, 275, (1938)
21) O.GESSNER: Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa. Heidelberg 1953
22) J.GRIMSHAW, H.R.JUNEJA: Chem. and Ind. 78, 656, (1960)
23) J.GRIMSHAW: Chem. and Ind. 79, 403, (1961)
24) H.GUSEVA: Akad. Nauk SSSR 85, 1353, (1953)
25) O.HALPERN, H.SCHMID: Helv.Chim.Act. 41, 1109, (1958)
26) R.HÄNSEL in H.F.LINSKENS: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin 1959
27) S.HATTORI, Y.KURIHARA: Misc. Repts. Res. Inst.Nat. 17 - 18, 163, (1950)
28) G.HEGI: Flora von Mitteleuropa. München 1906

29) H.HÉRISSEY: Bull. Soc. Chim. Biol. 8, 489, (1926)
30) W.HÜCKEL: Theoretische Grundlagen der organ. Chemie. Bd. II Leipzig 1954
31) G.W.IRVING, T.D.FONTAINE, S.P.DOOLITTLE: Science 102,9, (1945)
32) G.IVANOVICS, S.HORVÁTH: Nature 160, 297, (1947)
33) M.JANOT, E.SAIAS, M.FOUCHER: Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 1101, (1953)
34) G.JOHNSON, L.A.SCHAAL: Science 115, 627, (1952)
35) P.KARRER, H.SCHMID: Helv. Chim. Act. 29, 525, (1946)
36) Y.KATO: Fol. Pharmakol. Jap. 42/1, 37, (1946)
37) J.KLOSA: Arch. Pharmaz./Ber. dtsch. Pharm. Ges. 287/58, 313, (1954)
38) H.KÖHLER: Einführung in die Methode der pflanzlichen Antibiotikaforschung. Berlin 1956
39) H.LECLERC: Presse méd. 58, 543, (1950), ref. Chem. Zbl. 123/1, 2192, (1951)
40) H.LUDWIG: Arch. Pharmaz. 186, 64, (1868)
41) H.LUDWIG: Arch. Pharmaz. 192, 199, (1870)
42) J.C.MARUZELLA, M.FREUNDLICH: J.Amer.Pharm.Assoc.48/6, 356, (1956)
43) D.P.A.MATTHIOLUS: Kreutterbuch, bearbeitet durch CAMERARIUS, Frankfurt 1611
44) E.L.McCAWLEY, B.A.RUBIN, N.J.GIACOMINO: Fed.Proc.5, 191, (1946)
45) B.I.MONASTYRSKAYA, A.A.PETROPAVLOVSKAYA: Farmakol.i. Toksikol. 16/2, 30, (1953)
46) J.NAGSKI, M.J.COPLEY, J.F.COUCH: Journ. Bact. 54, 34 (1947)
47) Y.NAKAMURA: Journ. Chem. Soc. Jap. 71, 23, (1950)
48) G.ORZECHOWSKI: Pharmaz. Rdsch. 3, 41, (1961)
49) E.M.OSBORN: Brit. J. exp. Pathol. 24, 227, (1943)
50) R.PARIS, M.CHASLOT: Ann. Pharm. France 648, (1955)

51) R.PILGER: Plantaginaceae in A.ENGLER: Das Pflanzenreich IV, (1937)

52) F.B.POWER, H.ROGERSON: J. Chem. Soc. 97, 1944, (London 1910)

53) G.RATH: Convallaria majalis. Madaus Köln 1960

54) M.ROBERG: Arch. Pharmaz. 275, 84 u. 145, (1937)

55) F.A.ROBINSON: Antibiotics. New York 1953

56) F.ROLLERI: Arch. Pharmaz. 281, 118, (1943)

57) J.E.ROMBOUTS, J.LINKS: Experientia 12/2, 78, (1955)

58) L.J.ROSENFELD, R.L.CHAZANOWITSCH: Aptjetschnoje Djelo 7, 22, (1958), ref.Dtsch.Apotheker-Ztg. 100, 161, (1960)

59) E.SCHINDLER, H.ZIPP: Arzneimittel-Forsch. 10, 919, (1960)

60) H.SCHULZ: Wirkung und Anwendung der deutschen Arzneipflanzen. Ulm 1956

61) M.SIRAIT: Phytochemisch-pharmakognostische Untersuchungen einiger Vitex-Arten. Dissertation Berlin 1961

62) E.STAHL: Arch. Pharmaz./Ber. dtsch.Pharm.Ges.292/64, 411, (1959)

63) B.P,TOKIN: Phytoncide. Berlin 1956

64) A.R.TRIM, R.HILL: Biochem. J. 50, 310, (1952)

65) A.I.Virtanen: Angew. Chem. 70, 544, (1958)

66) H.WAGNER: Pharm. Zeitung 105, 1533, (1960)

67) N.WATTIEZ, M.HANS: Bull. Acad. roy. Med. Belg. 8, 386, (1943), ref. Chem.Zbl.114, 1241, (1944)

68) M.W.WENDT, W.HAEGELE, E.SIMONITSCH, H.SCHMID: Helv.Chim.Act. 43, 1440, (1960)

69) E.WINDE: Untersuchungen über die Verbreitung der Pseudoindikane. Agnusid, ein neues Pseudoindikan aus Vitex agnus castus L. Dissertation Berlin 1959

70) E.WINDE, R.HÄNSEL: Arch. Pharmaz./Ber.dtsch.Pharm.Ges. 293/65, 556, (1960)

71) A.G.WINTER und Mitarbeiter: Naturwissenschaften 39, 190 u. 237, (1952), 40, 167, 247 u. 489, (1953) 41, 337 u. 379, (1954)

Lebenslauf

Am 12. Mai 1933 wurde ich, Jörn E L I C H, Sohn des Volkswirtes Dr.Karlferdinand Elich und seiner Ehefrau Ilse, geb. Krüger in Berlin geboren. Mit sechs Jahren kam ich in die Volksschule in Berlin-Steglitz und besuchte anschließend die Oberschulen in Belzig (Mark), Borkheide (Mark) und nach dem Kriegsende in Berlin-Steglitz. Hier legte ich am 24. Februar 1953 die Reifeprüfung ab. Am 1. April darauf begann ich meine Lehrzeit als Apothekerpraktikant in der Urban-Apotheke in Berlin SW, das Pharmazeutische Vorexamen bestand ich im Frühjahr 1955. Anschließend studierte ich drei Semester lang Pharmazie in Erlangen, mußte dann aber das Studium aus finanziellen Gründen für ein Semester unterbrechen. Während dieser Zeit arbeitete ich in der Olympia-Apotheke in Schweinfurt/Main. Drei weitere Semester studierte ich dann in Würzburg und konnte dort im Oktober 1958 das Pharmazeutische Staatsexamen ablegen. Darauf arbeitete ich ein halbes Jahr lang in der Roland-Apotheke in Bad Bramstedt.

Seit dem 1. Mai 1959 befaßte ich mich unter Leitung von Herrn Professor Dr.R.HÄNSEL, Direktor des Institutes für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin und unter Leitung von Herrn Professor Dr.B.SCHMIDT, Direktor des Institutes für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin mit der vorliegenden Dissertation. Vom November 1959 an war ich als "wissenschaftliche Hilfskraft" am Institut für Pharmakognosie tätig; am 1. April wurde ich mit der Wahrnehmung der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten beauftragt.

Meine Approbation als Apotheker erhielt ich am 1.Nov.1959.

Ich bin verheiratet und habe zwei Kinder.

Druck: Arno Brynda, Berlin W 30